

JOANA DE PINA FERREIRA VEIGA MALTEZ

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA NA
CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS
TOTAIS NO LEITE DE BURRA DA RAÇA ASININA
DE MIRANDA**

Orientadora: Professora Doutora Cristiana Nunes

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2018

JOANA DE PINA FERREIRA VEIGA MALTEZ

**EFEITO DA RADIAÇÃO UTRAVIOLETA NA
CONTAGEM DE MICRORGANISMOS AERÓBIOS
TOTAIS NO LEITE DE BURRA DA RAÇA ASININA
DE MIRANDA**

**Dissertação defendida em provas públicas apresentada para a
obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no Curso
de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
Dia 24 de Maio com o Despacho Reitoral nº 166/2018
Com a seguinte composição de Júri:**

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso, representada
pelo Professor Doutor Manuel Pequito

Arguente: Professora Doutora Cristina Roseiro

Orientadora: Professora Doutora Cristiana Nunes

Vogal: Professor Doutor Manuel Pequito

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Faculdade de Medicina Veterinária**

**Lisboa
2018**

AGRADECIMENTOS

Neste espaço quero agradecer a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na realização desta última e tão esperada fase do curso.

À Professora Doutora Cristiana Nunes, que se disponibilizou de imediato para ser Orientadora da minha dissertação de mestrado, por ter acreditado no potencial do meu trabalho, por toda a ajuda, paciência e motivação que foram imprescindíveis para o resultado final.

À Professora Inês Viegas, pela simpatia e por todo o apoio prestado na análise dos dados.

Ao Professor Doutor João Brandão Rodrigues e ao Professor Doutor Miguel Quaresma, que são grandes referências no estudo da nossa raça Asinina de Miranda, pela partilha de conhecimentos e por me facultarem documentos fundamentais para a realização deste estudo.

À equipa Naturasin, Lda, Engenheiro Miguel Carvalho, Engenheiro Filipe Carvalho e Engenheiro Jorge Leal Barreto, por me proporcionarem todos os meios necessários para a realização deste projeto, e por toda a disponibilidade prestada. Um bem-haja pela luta constante na preservação da nossa raça Asinina de Miranda.

À Sanitejo – Agrupamento de Defesa Sanitária do Norte e do Vale do Tejo, na pessoa do doutor Manuel Romão, e à Sociedade Veterinária de Coruche na pessoa do doutor Luís Pissarra por todos os ensinamentos na área de sanidade animal, na clínica de ruminantes, e por me mostrarem o dia-a-dia de um veterinário de campo.

Ao doutor Nuno Figueiredo que teve um papel muito importante ao longo de todo o meu estágio, pela amizade que criámos, pela motivação, por toda a paciência e por me permitir acompanhá-lo no controlo clínico e reprodutivo em explorações de bovinos de leite. É sem dúvida um exemplo a seguir, enquanto clínico e enquanto pessoa. Não esquecerei a maneira como me recebeu e a alegria com que me transmitiu todos os conhecimentos.

A toda a equipa do laboratório do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa, muito obrigada por todas as condições proporcionadas, sem elas não seria possível a realização deste trabalho.

À equipa LusoPecus, uma referência na área de Reprodução Equina em Portugal, por me terem dado a oportunidade de perceber o que realmente gosto de fazer. Quero fazer um agradecimento especial ao doutor José Carlos Duarte e à doutora Cristina Cosinha, por toda a disponibilidade, amizade, profissionalismo, competência, ajuda e formação profissional que me continuam a oferecer. Não podia ter melhor equipa de trabalho.

Não posso deixar de agradecer o apoio e o incentivo de todos os meus amigos. Em especial ao Pedro Morais, Manuel Mendes e Mariana Cabral, foram uma força para que terminasse este percurso.

Por último e o mais importante, um grande agradecimento aos meus pais pelos princípios e valores transmitidos e por todo o apoio dado na minha vida pessoal e académica, ofereceram-me, sem dúvida, as maiores “armas” para seguir o meu caminho. Muito obrigada.

RESUMO

A raça Asinina de Miranda é uma raça autóctone portuguesa em vias de extinção que tem sido beneficiada pela evolução da área de cosmética em Portugal. Havendo interesse na sua conservação e caracterização, têm sido desenvolvidos diversos estudos sobre alguns aspectos reprodutivos carecendo de investigação na área de produção de leite.

A crescente demanda do mercado consumidor por produtos alimentares de alta qualidade estimula a utilização de novas tecnologias que garantam a segurança microbiológica na produção, que aumentem a vida útil dos alimentos, e que provoquem poucas alterações na qualidade sensorial e nutricional do produto final. A radiação ultravioleta foi recentemente considerada como um novo tratamento não térmico para o tratamento do leite.

O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da radiação ultravioleta nos microrganismos aeróbios totais no leite da raça Asinina de Miranda, proporcionando uma reflexão sobre a possibilidade da sua utilização por empresas do sector.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a radiação ultravioleta é uma tecnologia eficiente na redução do valor microbiano do leite que pode ser utilizada como alternativa aos tratamentos térmicos tradicionais, ou ser usada em associação com estes, dependendo do destino final do leite.

Palavras – chave: raça Asinina de Miranda; radiação ultravioleta; valor microbiano; leite de burra

ABSTRACT

The Asinina de Miranda breed is a Portuguese autochthonous breed that is undergoing extinction and has been benefited by the evolution of the cosmetic production in Portugal. In the interest of its conservation and characterization, several studies have been developed on some reproductive aspects however there is a lack of research regarding the milk production.

The increasing consumer demand for high quality food products stimulates the use of new technologies that ensure microbiological safety in the production process, increase the shelf life of food products and cause reduced changes in the sensory and nutritional quality of the final product. Ultraviolet radiation was recently considered as a new non-thermal treatment for the treatment of milk.

The objective of the current study was to analyze the effect of ultraviolet radiation on the total aerobic microorganisms in Asinina de Miranda's milk, providing a reflection on the possibility of its use by companies in the sector.

The results obtained allowed us to conclude that ultraviolet radiation is an efficient technology in reducing the microbial value of milk that can be used as an alternative to traditional thermal treatments or be used in association depending on the final destination of the milk.

Key words: breed Asinina de Miranda; ultraviolet radiation; microbial value; donkey milk

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ix
I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR.....	1
II. INTRODUÇÃO.....	4
III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Origem do burro doméstico.....	5
2. A raça Asinina de Miranda.....	8
3. Ciclo reprodutivo da fêmea asinina.....	12
4. O leite.....	16
4.1. A glândula mamária.....	17
4.2. Leite de origem asinina.....	20
4.3. Microrganismos frequentes do leite cru.....	24
5. Pasteurização.....	27
5.1. Tipos de pasteurização.....	28
5.2. Alterações provocadas pela pasteurização no leite.....	32
6. Tecnologias emergentes.....	35
7. A Luz.....	37
7.1. Radiação ultravioleta.....	38
7.2. Geração e propagação da radiação ultravioleta.....	39
7.3. Funcionamento da radiação ultravioleta.....	39
7.4. Equipamento UV para o tratamento de fluidos.....	40
7.5. Inativação dos microrganismos pela radiação ultravioleta.....	42
7.6. Ação da radiação ultravioleta no leite.....	44
IV. ANÁLISE PRÁTICA.....	46
1. Objetivos.....	46
2. Materiais e métodos.....	46
2.1. População em estudo e amostragem.....	46
2.2. Caracterização e funcionamento do protótipo.....	48
2.3. Cálculos efetuados para obtenção das amostras.....	49
2.4. Procedimento realizado na exploração.....	51

2.5.	Análises microbiológicas efetuadas no leite.....	52
3.	Métodos estatísticos.....	54
4.	Resultados	54
4.1.	Resultados dos testes preliminares	54
4.2.	Resultados do estudo efetuado	56
V.	DISCUSSÃO	60
VI.	CONCLUSÃO	64
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo das atividades realizadas na Sanitejo.	2
Figura 2. Resumo das atividades realizadas na Lusopecus.	2
Figura 3. Resumo das atividades realizadas na Sociedade Veterinária de Coruche.	2
Figura 4. Resumo das atividades realizadas na exploração de bovinos de leite.	3
Figura 5. Pintura em cerâmica encontrada no Irão, mostrando um burro com uma sela de carga de artefactos. (Disponível <i>online</i> : em www.iranicaonline.org/articles/donkey-ii)	6
Figura 6. Progenitora e cria de raça Asinina de Miranda (Fonte: Naturasin, Lda.).....	10
Figura 7. Burro de aguadeiro. Coleção de fotografia do Museu Municipal de Lagos (Disponível <i>online</i> em: http://delagos.pt/fototeca/index.php/Antigas/burro-de-aguadeiro).	11
Figura 8. Passeios de burro inseridos em atividades culturais e recreativas (Disponível <i>online</i> em www.aepga.pt).	11
Figura 9. Anatomia reprodutiva geral da fêmea asinina (Adaptada de Quaresma, 2014).	13
Figura 10. Ciclo éstrico da fêmea Asinina (Fonte:Quaresma & Payan, 2012).	15
Figura 11. Úbere de burra em lactação (Fonte: Naturasin, Lda).....	18
Figura 12. Esquema de um alvéolo (Adaptado de Ramos, 2017).....	18
Figura 13. Hormonas envolvidas no crescimento da glândula mamária e no início da secreção de leite. (Adaptada de Klein, 2014).....	20
Figura 14. Curva de lactação das burras (Adaptada de Salimei & Fantuz, 2012).....	21
Figura 15. Produção de leite de burra ao longo do período de lactação (Fonte: Salimei, 2011).	22
Figura 16. Circulação dos fluidos no permutador de placas (Disponível <i>online</i> em: http://www.nibleyco.com/apv-heat-exchangers/).	30
Figura 17. Espectro electromagnético (Adaptado de UV-B Monitoring and research program, Colorado State University).	37
Figura 18. Dimerização fotoquímica de duas bases de timina (Adaptado de Bolton, 2000).	43
Figura 19. Fêmeas da raça Asinina de Miranda (Imagem cedida pela Naturasin).....	47
Figura 20. Sala de ordenha (Imagem cedida pela Naturasin).....	47
Figura 21. Lotes de leite congelado (Imagem cedida pela Naturasin).	47
Figura 22. Protótipo - Bomba inox TRIN200 dosagem temporizada em monobloco com rodas (Fonte: o autor).	47
Figura 23. Esquema representativo da circulação do leite no protótipo. O leite sai do recipiente (1) através da ação da bomba (2), segue passando pela lâmpada UV (3), passa pelo ponto de recolha (4) e regressa ao recipiente (1) (Fonte: autor).	48

Figura 24. Copos das amostras identificados, cronómetro utilizado durante as recolhas e controlo do pH da água através das tiras de pH (Fonte: autor).	49
Figura 25. Esquema representativo do tubo de inox que inclui a lâmpada UV (Fonte: imagem cedida pela empresa Multifiltra, Lda.).....	51
Figura 26. Tubos de ensaio, placas de petri, bico de <i>busen</i> , pipeta e copo com amostra de leite de cru (Fonte: autor).....	53
Figura 27. Média do teor de microrganismos totais (TMT) ao longo dos momentos de contagem (1 a 6).....	57
Figura 28. Média da melhoria cumulativa (%) por momento de contagem (3 a 6).	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sazonalidade reprodutiva da fêmea da raça Asinina de Miranda. Encontramos nas linhas as burras observadas identificadas com números e nas colunas os meses do ano (Adaptado de Quaresma & Payan, 2012).	14
Tabela 2. Duração em dias do ciclo éstrico das fêmeas da raça Asinina de Miranda (Adaptado de Quaresma & Payan, 2012).....	14
Tabela 3. Composição e propriedades físicas do leite de burra, de vaca e de Mulher (Adaptado de Guo et al., 2007).	23
Tabela 4. Contagem microbiana em amostras de leite cru de origem asinina (Adaptada de Coppola et al., 2002).....	27
Tabela 5. Representação em percentagem da perda de alguns nutrientes no leite tratado com pasteurização rápida (HTST) e ultrarrápida (UHT). (Adaptada de Hardik & Atanu, 2017)	34
Tabela 6. Características da luz ultravioleta (Adaptado de Guerrero-Beltran & Barbosa-Cánovas, 2004).	38
Tabela 7. Tempo de exposição e dose UV.	50
Tabela 8. Descrição dos resultados do ensaio A.	55
Tabela 9. Descrição dos resultados do ensaio B.	55
Tabela 10. Estatística descritiva da variável TMT (teor MO aeróbios totais).	56
Tabela 11. Estatística descritiva da variável de melhoria cumulativa (%).....	57
Tabela 12. Apresentação dos valores de TMT 1 (ufc/mL) do leite sem tratamento, TMT 2 (ufc/mL) do leite pasteurizado com o método tanque (LTLT) e do valor de TMT 6 (ufc/mL) do leite tratado por radiação ultravioleta com dose 2000 J/L.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
ΣC	Soma das colónias contadas em duas placas de duas diluições sucessivas e que contenham pelo menos 10 colónias
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEPGA	Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino
ARN	Ácido ribonucleico
CL	Corpo Lúteo
d	Diluição correspondente à primeira diluição considerada
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
DUV	Dose ultravioleta
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (<i>Food and agriculture organization</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormona estimuladora de folículos (<i>Follicule stimulating hormone</i>)
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas (<i>Gonadotrophin releasing hormone</i>)
HTST	Pasteurização rápida (<i>High temperature short time</i>)
LH	Hormona luteinizante
LTLT	Pasteurização lenta (<i>Long temperature, long time</i>)
MO	Microrganismos
Nº	Número
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEF	Campo elétrico pulsado (<i>Pulsed Eletric Field</i>)
PL	Luz pulsátil
PUV	Potência da lâmpada x Eficiência
SOC.	Sociedade
SVC	Sociedade Veterinária de Coruche
TMT	Teor de microrganismos totais
Ufc	Unidade formadora de colónia
UHT	Pasteurização ultrarrápida (<i>Ultra high temperature</i>)
UV	Ultravioleta

I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO CURRICULAR

O presente relatório de estágio curricular vem resumir as principais conclusões a ser retiradas da participação num estágio curricular em duas entidades, a saber, no Agrupamento de Defesa Sanitária do Norte e Vale do Tejo (Sanitejo), durante outubro e novembro de 2014 sob orientação do doutor Manuel Romão, e na Lusopecus, empresa de Prestação de Serviços Veterinários e Comércio de Produtos Agropecuários, Lda. de fevereiro a abril de 2015 sob a orientação da Doutora Cristina Cosinha. Adicionalmente, foi ainda desenvolvido um estágio extracurricular na Sociedade Veterinária de Coruche, Lda. (SVC) sob a orientação do doutor Luís Pissarra, durante os meses de dezembro de 2014 e janeiro de 2015. Faz-se ainda uma breve nota sobre outras experiências relevantes. As passagens pelas diversas entidades, distinguem-se por versarem sobre diferentes espécies e especialidades. Assim, descrevem-se abaixo as principais observações a retirar.

Na Sanitejo, as espécies observadas foram maioritariamente bovinos, ovinos e caprinos num total de 5.087 casos clínicos. A Sanidade destacou-se como a área clínica com maior incidência, sendo constituída por vacinação, desparasitação e rastreio de algumas doenças de declaração obrigatória nomeadamente da tuberculose, leucose e brucelose. Relativamente à área de clínica médica foram observados essencialmente casos de neonatologia, sendo o mais comum a diarreia neonatal, e casos de reprodução como metrites, retenções placentárias, prolapsos uterinos e partos distócicos (figura 1).

Por outro lado, na Lusopecus, empresa que se dedica maioritariamente ao acompanhamento e tratamento de equinos, a área predominante é a reprodução. Aqui foram observados 730 casos desta especialidade. No entanto, foi prestada assistência direta a cerca de 514 casos clínicos, em diferentes áreas de intervenção, tais como a neonatologia, o aparelho digestivo, o aparelho musculo-esquelético, a dermatologia, a oftalmologia, a cirurgia, a traumatologia, a profilaxia, a dentisteria e o aparelho respiratório (figura 2).

Finalmente durante o período de estágio na SVC o foco foi essencialmente em ruminantes. Tendo as áreas de intervenção com maior número de observações sido a sanidade, o aparelho digestivo, a neonatologia e a reprodução, somando um total de 1.141 casos observados (figura 3).

No que respeita a outra experiência relevante, importa ainda mencionar que no período entre outubro de 2014 e julho de 2015 foi realizado um acompanhamento reprodutivo semanal a uma exploração de bovinos de leite sob a supervisão do doutor Nuno Figueiredo. Durante esses 9 meses foram realizados cerca de 3.000 diagnósticos de gestação e foi prestada assistência a cerca de 193 casos em áreas como aparelho reprodutor, aparelho digestivo, aparelho respiratório e aparelho músculo-esquelético (figura 4).

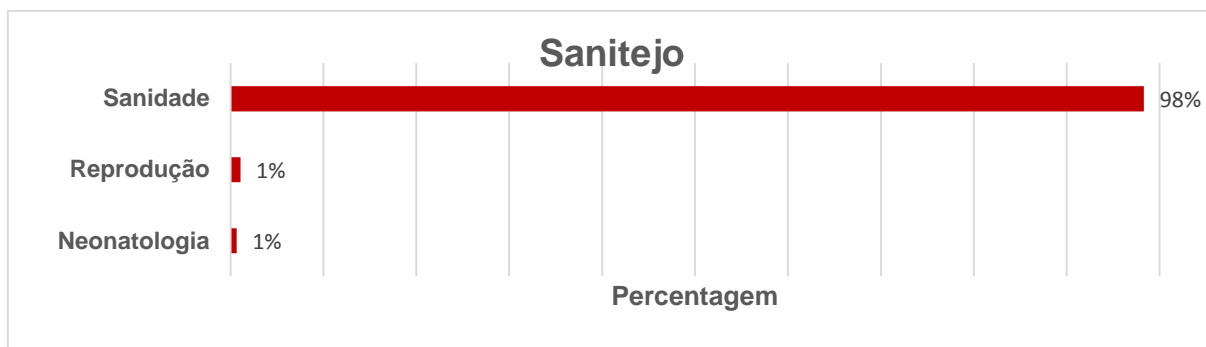


Figura 1. Resumo das atividades realizadas na Sanitejo.

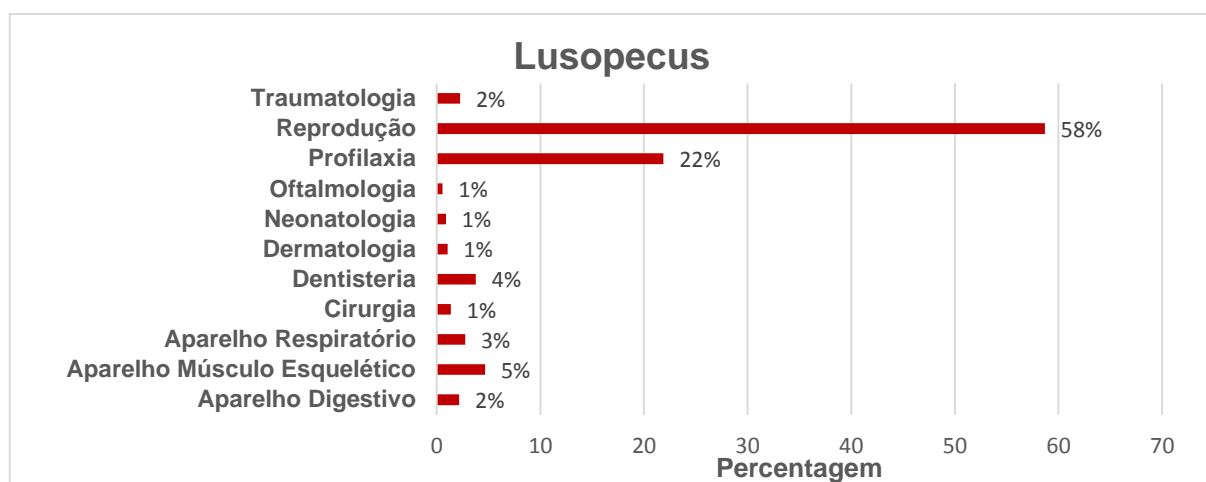


Figura 2. Resumo das atividades realizadas na Lusopecus.

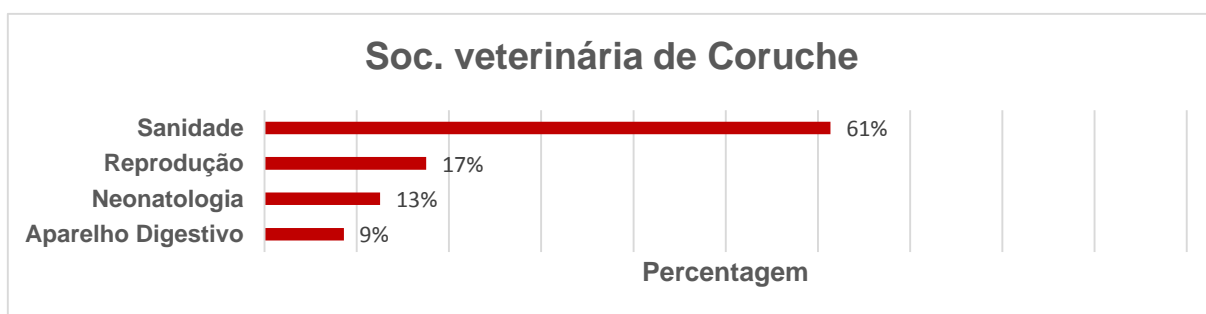


Figura 3. Resumo das atividades realizadas na Sociedade Veterinária de Coruche.



Figura 4. Resumo das atividades realizadas na exploração de bovinos de leite.

II. INTRODUÇÃO

A Medicina Veterinária é muito mais do que a prestação de cuidados de saúde aos animais, é um ramo da Ciência que engloba componentes dedicados ao entendimento da relação Homem - animal e à proteção da saúde humana. Atualmente, o Médico Veterinário tem um papel transversal na cadeia alimentar, nas vertentes tecnológica e de inspeção dos alimentos. O seu controlo e vigilância são essenciais em todas as fases da produção, transformação, processamento industrial, comercialização, armazenamento e consumo de produtos e subprodutos de origem animal, a fim de garantir a saúde de um ponto de vista integrado, tanto para os seres humanos como para os animais, e a proteção do meio ambiente (Hoet, 2011).

A crescente demanda do mercado consumidor por produtos alimentares de alta qualidade leva à necessidade de utilização de tecnologias que garantam a segurança microbiológica na produção, aumentando a vida útil do produto, e que provoquem poucas alterações na qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. Alguns processos não térmicos têm vindo a ser aplicados na preservação de alimentos sem causar os efeitos adversos do uso do calor. Um desses processos é a irradiação de alimentos com radiação ultravioleta (UV), que tem sido bastante estudada pela sua eficiência na inativação microbiológica na água e na superfície de diversos materiais. Os primeiros equipamentos comerciais de ultravioleta foram produzidos para as indústrias farmacêuticas e de aquacultura, surgindo depois o interesse para a utilização desses equipamentos nas indústrias de alimentos. Diversas pesquisas têm sido desenvolvidas nessas áreas com o intuito de avaliar o efeito letal da radiação ultravioleta sobre os microrganismos e as eventuais alterações nas características sensoriais dos produtos (López-Malo & Palou, 2005). A radiação ultravioleta foi recentemente considerada como um novo tratamento não térmico para o tratamento do leite, e neste âmbito, o objetivo deste estudo piloto foi analisar o efeito da radiação UV nos microrganismos aeróbios totais no leite da raça Asinina de Miranda, proporcionando assim uma reflexão sobre as possibilidades do seu uso no tratamento do leite (Devlieghere, Vermeiren & Debevere, 2004; Yin, Zhu, Koutchma & Gong, 2015).

Este estudo foi desenvolvido em colaboração com a Naturasin Lda., uma empresa portuguesa situada no Monte das Faias no Couço, que se dedica à criação de gado da raça Asinina de Miranda e à produção de leite de burra em pó, que tem como principal destino a indústria da cosmética. Com o objetivo de evoluir tecnologicamente, a empresa ponderou implementar uma tecnologia emergente no tratamento do leite, a radiação ultravioleta, e, a fim de avaliar o efeito desta radiação nos microrganismos aeróbios totais do leite de burra, foi desenvolvido um protótipo de tratamento UV em conjunto com a empresa Multifiltra, Lda.

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Origem do burro doméstico

Os burros, *Equus asinus*, acompanham o Homem desde os tempos do Neolítico, tendo sido, segundo alguns autores, domesticado ainda antes do cavalo (Svendsen, Bagwell & Courtney, 1997; Yanes, 1999; Carette, 2000). Segundo Xu, Janke & Arnason (1996), os burros evoluíram dos equinos comuns há aproximadamente nove milhões de anos. Esta sugestão, feita com base na análise do ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, vem apontar para uma data bastante anterior à sugerida por informações paleontológicas, que refere esta evolução como tendo ocorrido num período entre três e cinco milhões de anos atrás (Lindsay, Opdyke & Johnson, 1980).

Os burros e os restantes equídeos existentes são incluídos na família *Equidae*, a qual é composta pelas raças, estirpes e tipos de cavalos domésticos, cavalos selvagens, asnos e os seus antepassados (Evans, Burton, Hintz & Van Vleck, 1979). Esta família compreende três subfamílias: *Hyracotherinae*, *Paleotherinae* e *Equinae*, surgindo nesta última o género da espécie *Equus*, que com variações evolutivas e também com algumas mutações, deu origem aos subgéneros aos quais pertencem cavalos, zebras e asininos (Yanes, 1999).

Sabe-se que as duas únicas espécies de equídeos domésticos que existem hoje são o cavalo, *Equus caballus*, e o burro, *Equus asinus*, aos quais devemos acrescentar os híbridos, como os muars (Nadal, Albizuri & Maroto, 2010). Desde a antiguidade que o Homem tem aproveitado as semelhanças anatómicas, fisiológicas e zootécnicas do cavalo e do burro, bem como a sua grande afinidade biológica, para realizar cruzamentos que produzam híbridos viáveis, bem formados, fortes, aptos e que em muitos aspetos superam os progenitores (Yanes, 1999). As mulas e os machos demonstram, muitas vezes, vigor híbrido nas características físicas, tendendo a ser mais fortes e mais resistentes do que o cavalo, e tão rústicos quanto o burro (Travis, 1990).

A história e a origem do burro são particularmente interessantes, no entanto dados históricos da sua propagação são escassos (Beja-Pereira et al., 2004; Blench, 2004). No que respeita à ascendência genealógica do burro doméstico é grande a diversidade de teorias (Afonso, Candeias & Pratas, 2013). As origens do burro doméstico foram avaliadas com base em amostragens de burros oriundos de cinquenta e dois países do Velho Mundo. Com recurso a análises filogenéticas, foram identificados dois grupos altamente divergentes, tendo ficado os burros asiáticos excluídos das origens do burro doméstico, sendo os asnos africanos os progenitores mais prováveis (Beja-Pereira et al., 2004). É agora amplamente aceite que na origem do burro doméstico estejam o *Equus africanus africanus*, o burro selvagem *Nubian*, e

o *Equus africanus somaliensis*, o burro selvagem somaliano (Epstein, 1984; Camac, 1986). O *Equus africanus africanus* teve origem no norte de África, entre a costa do Mediterrâneo e o deserto do Saara, enquanto o *Equus africanus somaliensis* é de leste, das zonas a sul do mar Vermelho (Camac, 1986). Contudo, existe uma teoria que recebe também muita aceitação, a teoria difilética de Sanson, que defende a divisão dos asininos domésticos em dois troncos: o tronco africano, *Equus asinus africanus*, proveniente da bacia do Nilo, e o tronco europeu, *Equus asinus europeus*, com origem provável na região mediterrânica (Ruiz, 2000).

A domesticação do burro ocorreu há cerca de cinco mil anos (figura 5), transformando sociedades antigas e permitindo o desenvolvimento de antigas rotas comerciais terrestres (Kimura et al., 2010). Os burros como animais adaptados ao deserto, aliada à sua capacidade de transportar cargas pesadas por terras áridas, permitiu aos pastores deslocarem-se com as suas famílias de forma nómada (Rossel et al., 2008).



Figura 5. Pintura em cerâmica encontrada no Irão, mostrando um burro com uma sela de carga de artefactos. (Disponível online: em www.iranicaonline.org/articles/donkey-ii)

O processo de domesticação já foi definido algumas vezes, contudo, segundo Price (1984) é difícil formular uma definição para domesticação que seja geral o suficiente para ter em conta a grande variedade observada em diferentes espécies e em diferentes ambientes de cativeiro, e que seja específico o suficiente para ser significativo em termos de processos biológicos envolvidos (Peters, Driesch & Helmer, 2005).

Identificar o local da domesticação tem sido um desafio porque os registos arqueológicos são raros. Como os vestígios dos primeiros burros foram encontrados no Egipto antigo, os arqueólogos concluíram que foram domesticados pelos moradores do Vale do Nilo. Uma das bases para esta visão foi a descoberta, por Sir Flinders Petrie, de três esqueletos num túmulo da primeira dinastia em Tarkhan no Egipto cerca de 2850 a.C.. Identificações

precisas são difíceis nesta região devido à presença ubíqua do burro selvagem asiático, *Equus hemionus*, mas estes achados e a descoberta de ossos identificados como sendo de burro selvagem africano levantaram a hipótese de os burros terem sido domesticados nesta zona do globo (Rossel et al., 2008).

Existem indícios de que os burros tenham sido trazidos para a Península Ibérica pelos fenícios, estabelecendo-se nas zonas a sul durante o início do primeiro milénio antes de Cristo (Aubert, 1987; Nadal, 2000). Desde esse período que assumem um importante papel na vida do Homem, sendo a maior parte dos burros usados no trabalho, principalmente como meio transporte e de carga, e também na agricultura, puxando água, ajudando na lavoura e carga das colheitas, entre outras operações (Starkey & Starkey, 1996).

Nos animais, o processo de diferenciação de variantes ou raças locais foi moroso e especializado. Deve entender-se por raça, um conjunto de indivíduos de características uniformes, com registo de ascendência conhecido, e que em alguns casos têm os mesmos objetivos de seleção (Beja-Pereira & Almeida, 2005).

A grande maioria das raças locais surgiu com base numa seleção natural e de técnicas simples de cruzamento e seleção, usadas por produtores que não tinham acesso a quaisquer tecnologias de genética e melhoramento (Hoffman, 2010). Como consequência surgiram algumas das principais raças atualmente existentes na Europa e Estados Unidos, casos da raça Catalã, Zamorano-Leonesa de Espanha, da qual surgiu a nossa raça Asinina de Miranda, a raça Piamonte, Sardenha e Sicília de Itália, raça Poitu e Gasconha de França e Mammoth Jackstock dos Estados Unidos (Yanes, 1999; Quaresma, Nóvoa, Monteiro, Almeida & Portaset, 2005). A diversidade de hoje em dia é o resultado de anos e anos de seleção, quer natural, quer feita pelo Homem, misturas de eventos mutacionais e derivações genéticas, assim como alterações no ambiente e na produção (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura [FAO] 2009).

É indiscutível a importância da defesa e salvaguarda de todas estas raças, que são o resultado de um extenso período de evolução que as dotou sobretudo, da uniformidade e de um potencial genético que lhes permitiu a adaptação ao seu meio ambiente e às suas diversidades (Afonso et al., 2013).

2. A raça Asinina de Miranda

Entre os animais domésticos, o burro ainda desempenha um papel importante no desenvolvimento da sociedade humana (Chen, Sun, Manglai, Min & Panet, 2010). Embora as estimativas nacionais de populações de burros não sejam precisas, ilustram as tendências gerais. No final do século passado era estimada a existência de 44 milhões de burros no Mundo, quase todos mantidos para trabalho (Starkey & Starkey, 1996). Em 2007, a FAO informou uma diminuição do número de burros no Mundo para 41 milhões (Quaresma, 2015). Das cento e sessenta e duas raças de burros oficiais em todo o Mundo, apenas cinco delas não estão em risco e seis estão já consideradas extintas (Rischkowsky & Pilling, 2007). Na Europa estão presentes cinquenta e cinco raças mas a progressiva mecanização da atividade agrícola, o êxodo rural e a consequente redução da utilização de burros e mulas de trabalho, causou uma diminuição gradual desde o final da Segunda Guerra Mundial (Beretti, Zanon, Soffiantini & Sabbioni, 2005; FAO, 2013). Hoje em dia, o uso de burros para trabalho ou transporte quase desapareceu, e na Europa é visto principalmente como um animal de estimação ou como atração em zonas turísticas (Kugler, Grunenfelder & Broxham, 2008; Colli et al., 2013).

As raças de burros que sofreram um declínio substancial no tamanho da população podem apresentar níveis elevados de endogamia, resultando em depressão e risco de extinção (Ciampolini et al., 2007). A extinção de raças tem como consequência a perda irreversível de diversidade genética (Bennewitz et al., 2006). Sabendo que a sobrevivência a longo prazo de uma população depende da manutenção da variação genética para a aptidão individual e adaptabilidade da população, a avaliação e conservação da variabilidade genética em raças com poucos indivíduos, como o burro, é uma crescente preocupação em todo o Mundo pelo alto risco de perda de raças (Lacy, 1995; Aranguren-Méndez, Jornada & Gomez, 2001). Como disse Robertson (1963) “Uma raça pode estar realmente morta antes que alguém se dê conta que está doente”.

Em Portugal, assim como um pouco por todo Mundo, e até um passado recente, o burro foi sistematicamente subestimado e esquecido, não tendo sido desenvolvidos quaisquer programas de preservação ou melhoramento. No entanto, as características do nosso mundo rural, nomeadamente nas regiões do interior, permitiram que o efetivo asinino se mantivesse até aos dias de hoje. Foi precisamente na zona mais remota de Trás-os-Montes que se conservou aquela que é, sem dúvida, uma das últimas variedades autóctones de asininos no território nacional: a raça Asinina de Miranda (Quaresma et al., 2005). O burro da raça Asinina de Miranda foi reconhecido primeiramente pela Engenheira Luísa Samões, que caracterizou a população de burros no Parque Natural do Douro Internacional. Em 2002, a raça foi

oficialmente reconhecida pelas autoridades nacionais que criaram o livro genealógico da raça, a ser mantido pela Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino (AEPGA), em Miranda do Douro (Quaresma, 2015). Pelas suas particularidades morfofuncionais, a raça Asinina de Miranda distingue-se das demais por características ligadas à pelagem, comprimento do pêlo, conformação, beleza, tamanho, função, comportamento e solar de origem, o Planalto Mirandês (figura 6). O padrão da raça Asinina de Miranda exige:

- Aspeto geral: animal bem conformado, com manifesta acromegalia, corpulento e rústico com altura, medida com hipómetro ao garrote, nos animais adultos, maior que 1,20m. A altura recomendável é 1,35 m, podendo ser maior;

- Pele e pelagem: castanha escura, com gradações mais claras nos costados e face; branca no focinho e contorno dos olhos; pêlo abundante, comprido e grosso, aumentando na zona dos costados, face, entre-ganachas, bordos das orelhas e extremidades dos membros; crinas abundantes; ausência de sinais;

- Cabeça: volumosa e com ganachas exuberantes, de perfil reto; fronte larga e levemente côncava na linha mediana coberta de pêlo, chegando a formar-se sobre a fronte uma espécie de franja; arcadas orbitárias muito salientes; face curta de chanfro largo; canal entre-ganachas largo; lábios grossos e fortes; orelhas grandes e largas na base, revestidas no seu bordo interior de abundante pilosidade, arredondadas na ponta e dirigidas para a frente; olhos pequenos, dando ao animal uma fisionomia sombria;

- Pescoço, garrote e dorso: pescoço curto e grosso; garrote baixo e pouco destacado; dorso tendendo para a horizontalidade, curto e bem musculado; peitoral amplo com quilha saliente; tórax profundo; costado encurvado; garupa mais elevada que o garrote, pouco destacada; espáduas curtas e bem desenvolvidas com ligeira inclinação; ventre volumoso;

- Membros: grossos, de articulações volumosas, providos de pêlo cobrindo os cascos, machinhos bem desenvolvidos; membros posteriores com tendência a serem estendidos e um pouco canejos; cascos amplos;

- Andamentos: de grande amplitude, mas lentos e pouco ágeis (Afonso et al., 2013).



Figura 6. Progenitora e cria de raça Asinina de Miranda (Fonte: Naturasin, Lda.).

Às características de excecional rusticidade, sobriedade, longevidade e polivalência que caracterizam os asininos, a raça Asinina de Miranda acrescenta ainda força e docilidade. O burro, em geral, encontra-se em extinção e a raça Asinina de Miranda não é exceção (Associação para o Estudo e Proteção do Gado Asinino [AEPGA], 2012). Ao longo das últimas décadas, tanto em Trás-os-Montes como no resto do país, o número de burros tem diminuído de forma acentuada (Barbosa, 2003). Em Portugal, no ano de 1979, existiam cento e dois mil burros, já em 2009 existiam apenas dez mil burros e mulas. No Planalto Mirandês, a população de asininos é hoje menos de 10% em relação à de 1979 (Quaresma, Martins, Rodrigues, Colaço & Payan-Carreira, 2013). Em termos quantitativos, com base em dados de 2012, existem cerca de 780 fêmeas reprodutoras e 48 machos em todo o país (Afonso et al., 2013).

O Burro de Miranda contribuiu ao longo de gerações com a sua presença, personalidade e força no dia-a-dia das populações (figura 7), mas a mecanização dos trabalhos agrícolas, o abandono do mundo rural e da agricultura de subsistência, levou ao desaparecimento de importantes valores culturais e tradicionais (Rodrigues, Iralde, Pérez & Rodriguez, 2007; AEPGA, 2012).



Figura 7. Burro de aguadeiro. Coleção de fotografia do Museu Municipal de Lagos (Disponível *online* em: <http://delagos.pt/fototeca/index.php/Antigas/burro-de-aguadeiro>).

Atualmente são as pernas, mãos, olhos e companheiros de uma população envelhecida. A idade avançada das fêmeas reprodutoras, associada a problemas reprodutivos são fatores que intervêm de forma decisiva na regressão desta raça (Rodrigues et al., 2007).

A presença destes animais nas paisagens rurais surge como um complemento da imagem da região de Trás-os-Montes, levando o seu desaparecimento a uma degradação da paisagem (Quaresma et al., 2013). É assim um elemento insubstituível do mundo rural do nordeste transmontano que poderá vir a ser uma interessante mais-valia como recurso económico, com o surgimento de atividades alternativas de turismo rural, como passeios turísticos em burros ou utilização como animal de companhia, o que poderá significar um aumento no rendimento dos criadores e consequentemente o enriquecimento do património cultural e ambiental da região (Quaresma et al., 2005; Afonso et al., 2013) (figura 8).



Figura 8. Passeios de burro inseridos em atividades culturais e recreativas (Disponível *online* em www.aepga.pt).

3. Ciclo reprodutivo da fêmea asinina

A importância da reprodução consiste em assegurar a manutenção de uma espécie (Gurtler, Ketz, Kolb, Schroder & Seidel, 1984). Na literatura veterinária a informação acerca das características reprodutivas dos asininos, incluindo comportamento de estro e características do ciclo éstrico, é bastante limitada em comparação com os equinos (Blanchard & Taylor, 2005). Existem semelhanças entre asininos e equinos, sendo que ambos pertencem ao mesmo gênero, *Equus*, no entanto, existem algumas diferenças significativas, especialmente quando se discute reprodução (Hagstrom, 2004). Os asininos apresentam diversas particularidades reprodutivas em relação aos equinos que vão desde a duração do ciclo éstrico e da gestação até ao modo como manifestam o comportamento de estro, nas fêmeas, e de corte, nos machos (Quaresma, Rasquinho, Gomes, Nogueira & Payan-Carreira, 2007).

Para que as fêmeas iniciem os seus ciclos reprodutivos, estas devem passar por um processo chamado de puberdade (Cunningham & Klein, 2008). As burras atingem a puberdade entre os doze e os vinte e quatro meses de idade. O início deste processo é o resultado da interação de muitos fatores, presumivelmente, o plano de nutrição, o genótipo, o fotoperíodo, a temperatura e a ausência de doença (Fielding, 1988). Fisiologicamente, o início da maturidade sexual dá-se sob a influência do aumento da secreção da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo, que promove um aumento da síntese e da libertação da hormona folículo estimulante (FSH), e da hormona luteinizante (LH), do lobo anterior da hipófise. A FSH estimula, nas fêmeas, a formação e maturação dos folículos terciários, nos quais se dá a síntese de estrogénios sob a influência da LH. Sob a influência dos estrogénios, a trompa, o útero e a vagina aumentam de volume e o crescimento da glândula mamária é estimulado (Gurtler et al., 1984). As fêmeas consideram-se aptas para a reprodução quando atingem os três anos de idade, assegurando o seu completo desenvolvimento corporal e evitando assim problemas no parto (Rodrigues et al., 2007).

Anatomicamente, as burras, quando comparadas com as éguas, têm um cérvix mais longo e com menor diâmetro, e com uma localização mais cranial no trato reprodutivo (Hagstrom, 2004) (figura 9). O cérvix apresenta um comprimento que varia entre 45 a 70 mm, variando o seu diâmetro entre 28 e 35 mm. A ocorrência de pregas longitudinais tortuosas dentro do canal cervical parece ser uma característica específica das burras (Quaresma, 2014). A vulva é inclinada ventralmente, tem cornos uterinos bem desenvolvidos e apoiados no chão pélvico (Alvarez, Serres, Gabriel & Gómez-Cuétara, 2005). Os ovários têm a forma de feijões, possuindo uma fossa de ovulação no seu bordo livre (Quaresma, 2014).

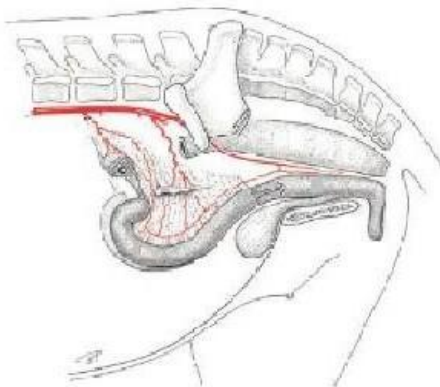


Figura 9. Anatomia reprodutiva geral da fêmea asinina (Adaptada de Quaresma, 2014).

Em termos de ciclicidade reprodutiva, as burras, regra geral, são cíclicas todo o ano, contudo, em alguns animais são observáveis variações sazonais, relacionadas com o fotoperíodo (Taylor, Matthews & Blanchard, 2002). O fotoperíodo controla a ocorrência de ciclos reprodutivos em várias espécies domésticas, resultando num período anual em que apresentam atividade ovárica contínua (cíclica) e outro período sem atividade ovárica, denominado de anestro (Cunningham & Klein, 2008). Segundo um estudo de Ginther (1987), a divisão dramática do ano em estações ovulatórias e anovulatórias, como ocorre em éguas, é ausente ou limitada nas burras. Podemos constatar este facto nas burras de raça Mirandesa (tabela 1).

Quaresma & Payan, 2012).

	ÉPOCA REPRODUTIVA								
	ÉPOCA DE TRANSIÇÃO								
	ANESTRO SAZONAL								
	BURRAS IRREGULARES								

Relativamente à duração do ciclo éstrico das burras, este pode variar entre 20 a 40 dias, (Quaresma, 2014). Nos Estados Unidos da América, segundo Vandeplassche, Wesson & Ginther (1981), o ciclo éstrico das burras dura $24,9 \pm 0,7$ dias, tendo o diestro $19,3 \text{ dias} \pm 0,6$ dias e o estro $6,4 \pm 0,6$ dias, sendo que em burras da raça Anatoliana o ciclo éstrico é de cerca de $25,0 \pm 1,73$ dias. No entanto, Blanchard, Taylor & Love (1999), Nishikawa & Yamazaki (1999) e Galisteo & Perez-Marin (2010), descreveram um período mais curto, 22,8, 23,3 e 23,8 dias, respetivamente. De acordo com Quaresma & Payan (2012) podemos caracterizar o ciclo éstrico da nossa raça Mirandesa através da tabela 2.

Quaresma & Payan, 2012).

	Ciclo Éstrico	Diestro	Estro
Média	24,53 Dias	18,74 Dias	5,83 Dias

Durante o ciclo éstrico, tal como ocorre em outras espécies, a burra apresenta uma fase estrogénica ou fase folicular e uma fase progestagénica ou fase lútea como demonstra a figura 10.

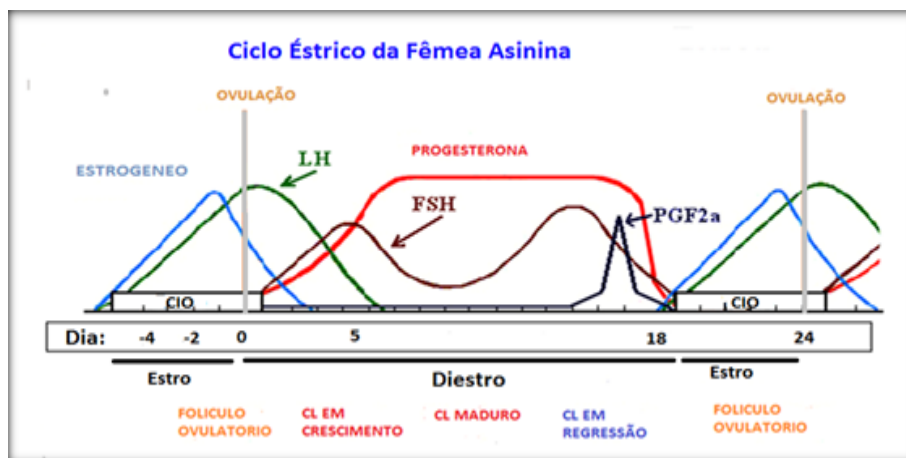


Figura 10. Ciclo éstrico da fêmea Asinina (Fonte:Quaresma & Payan, 2012).

A atividade gonadal está sob controlo do hipotálamo e da glândula hipofisária anterior (Cunningham & Klein, 2008). A comunicação hormonal entre os órgãos do sistema reprodutivo e o sistema nervoso central é essencial para que os eventos que ocorrem na vida reprodutiva sejam atempados e rítmicos (Youngquist & Threlfall, 2007). A adeno-hipófise produz hormonas proteicas importantes no controlo da reprodução, entre elas, duas gonadotrofinas, a hormona folículo-estimulante, FSH, e a hormona-luteinizante, LH. Estas são sinérgicas no desenvolvimento e ovulação dos folículos ovários, a FSH desempenha um papel mais importante durante o crescimento folicular e a LH desempenha um papel mais dominante na fase final da maturação do folículo, através da ovulação (Cunningham & Klein, 2008). A dinâmica do crescimento folicular durante o ciclo éstrico das burras demonstra grande semelhança com a que ocorre em éguas, o que sugere a ocorrência das mesmas ondas foliculares (Ginther, 1993). O aumento da libertação de estrogénios na fase de maturação total dos folículos leva ao desenvolvimento do cio ou estro (Gurtler et al., 1984).

Os sinais de cio mais evidentes na burra são mascar, abrindo e fechando a boca com orelhas para trás e pescoço estendido, intranquilidade com aumento da agressividade, micções curtas e frequentes, exteriorização do clitóris e apresentação da garupa com aceitação da monta (Taberner, Medrano, Peña, Rigau & Miro, 2008; Quaresma & Payan, 2012). Os movimentos da boca fazem um som característico que é audível pelo ser Humano a vários metros de distância (Mcdonell, 1998).

Nesta fase, enquanto o folículo predominante cresce e produz mais estradiol, os restantes folículos começam a atrofiar devido à produção de inibina pelas células da granulosa

do folículo dominante, induzida pelo estradiol (Ginther, 2000; Youngquist & Threlfall, 2007; Ginther, Araújo, Palhão, Rodrigues & Beg, 2009).

Segundo Taberner et al. (2008), o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios foi de $44,9 \pm 0,5\text{mm}$, podendo este variar entre 35 e 60 mm. Em múltiplas ovulações o tamanho médio dos folículos pré-ovulatórios foi de $44,1 \pm 0,6\text{mm}$ e em ovulações simples, $46,3 \pm 0,9\text{mm}$. A incidência de duplas ovulações parece ser maior nos asininos do que nos equinos, verificando-se no entanto uma grande variedade entre estudos (Quaresma & Payan, 2012). A taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório foi de 3,7 mm por dia, mas este número diminuiu nas últimas 24 horas antes da ovulação (Taberner et al., 2008; Kalender et al., 2012). A ovulação nas burras ocorre geralmente 5 a 6 dias após o início do estro (Hagstrom, 2004). Os eventos da ovulação e consequente formação do corpo lúteo (CL) envolvem hormonas sistémicas e locais que sinalizam a degeneração e a morfogénese da teca, da granulosa e de outras células associadas ao folículo pré-ovulatório (Samper, Pycock & McKinnon, 2007). A ovulação ocorre como resultado da resposta do folículo dominante ao aumento da concentração de LH circulante (Youngquist & Threlfall, 2007). O corpo lúteo forma-se a partir da parede do folículo que entra em colapso após a ovulação, sendo a sua principal função a secreção de progesterona, que prepara o útero para o início e manutenção da gestação (Cunningham & Klein, 2008). A duração média da gestação em burras é de 360 a 375 dias ou mais (Hagstrom, 2004). Regra geral, a vesícula embrionária pode ser detetada entre os dias 10 e 13 de gestação, com uma dimensão entre os 19 e os 24mm (Quaresma & Payan, 2012).

Pode verificar-se que o comportamento reprodutivo dos asininos tem várias peculiaridades que merecem um estudo mais aprofundado. Estas diferenças são observáveis tanto em machos como em fêmeas. Existem também indícios de existirem diferenças apreciáveis entre raças, no que diz respeito à frequência e duração dosaios, assim como ao comportamento neste período, não se podendo, no entanto, afirmar se tal se deverá a características genéticas próprias, ou a diferenças ambientais (Quaresma et al., 2007).

4. O leite

O leite, do ponto de vista biológico pode ser considerado um dos alimentos mais completos, sendo uma secreção fisiológica e nutricionalmente equilibrada, adequada a todas as exigências dos recém-nascidos (Criscione et al., 2008). O estabelecimento da lactação após o parto é essencial para a sobrevivência de todas as espécies de mamíferos, e devem ser produzidas quantidades suficientes de leite, a partir de então, para garantir o crescimento e o desenvolvimento saudável da cria (Chavatte-Palmer, 2002). A composição do leite é o resultado de uma complexa associação de fatores genéticos como a espécie e a raça,

fisiológicos como a idade e a fase de lactação, e ambientais como a alimentação e o clima, possibilitando oferecer aos humanos uma gama muito diversificada de produtos, através das características organoléticas, da sua composição físico-química e do seu potencial tecnológico (Faye & Konuspayeva, 2012).

4.1. A glândula mamária

Os animais que pertencem à classe *Mammalia* têm a capacidade de alimentar as suas crias através de uma estrutura denominada glândula mamária. A capacidade dos mamíferos de nutrirem as suas crias através da secreção do leite por estas glândulas durante o período pós-fetal de vida, tem dado a estes animais uma maior capacidade de sobrevivência (Klein, 2014).

A glândula mamária, à semelhança das glândulas sebáceas e sudoríparas, é uma glândula cutânea, e a sua anatomia difere muito entre espécies (Wiktorsson et al., 2001; Reece, 2006). Nos animais domésticos dá-se o nome de úbere ao conjunto das glândulas mamárias com os tetos, e pode ser classificado quanto à sua localização, sendo inguinal nas vacas, ovelhas, cabras e éguas, e abdominal na gata, cadela e porca (Reece, 2006; Ghezzi, Castro, Dominguez, Islas & Illia, 2011).

O processo de secreção do leite é semelhante em todas as espécies de mamíferos, no entanto, a sua composição química, o seu armazenamento e excreção variam de espécie para espécie (Valdés, Sánchez & Labbok, 1996). A vaca possui quatro glândulas mamárias independentes, isto é, cada glândula é drenada pelo seu próprio sistema de ductos, cisterna de armazenamento e teto, bem como a ovelha e a cabra que possuem duas glândulas mamárias independentes e dois tetos. A porca pode ter quatro a nove pares de tetos, e visto que cada teto tem dois canais que drena um par de glândulas, pode ter oito a dezoito pares de glândulas (Hafez, 1980). Os equídeos têm normalmente quatro glândulas independentes, no entanto possuem apenas dois tetos. Cada teto é composto por dois canais e por duas cisternas provenientes de duas glândulas. Assim, o lado esquerdo possui duas glândulas que se exteriorizam no teto esquerdo e o lado direito possui igualmente duas glândulas que se exteriorizam no teto direito (Reece, 2009) (figura 11).



Figura 11. Úbere de burra em lactação (Fonte: Naturasin, Lda).

Relativamente à sua composição histológica, esta glândula é semelhante em todas as espécies. Existem dois tipos principais de tecidos: primeiro o parênquima ou tecido glandular e, secundariamente, o estroma ou tecido de sustentação. O parênquima abrange os alvéolos (figura 12), células secretoras da glândula mamária, que a partir de nutrientes fornecidos pelo sangue promovem a síntese do leite e a sua excreção para o sistema de ductos que o drena para as cisternas (Valdés et al., 1996; Noro, 2001). O aporte de nutrientes para a síntese de compostos do leite tem origem tanto exógena, através da dieta, como endógena, através da mobilização de reservas orgânicas (Soares & González, 2013).

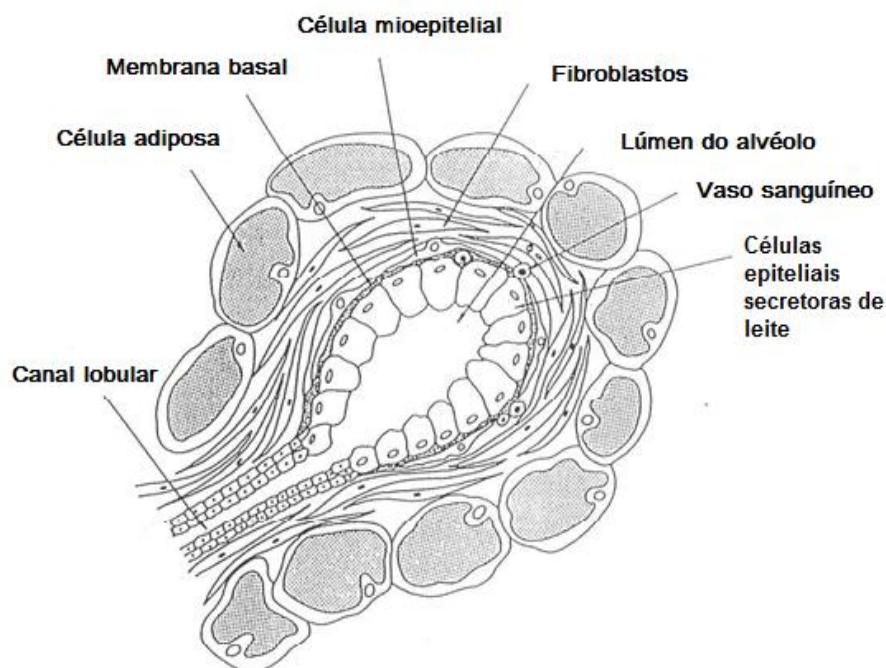


Figura 12. Esquema de um alvéolo (Adaptado de Ramos, 2017).

A função essencial da glândula mamária é produzir leite para nutrir o recém-nascido. Segundo Peaker, Wilde & Knight (1998), a glândula mamária é uma glândula exócrina única em dois aspetos: a secreção é contínua durante a lactação, ao contrário de várias outras glândulas exócrinas que só secretam em resposta a um estímulo, e a substância secretada é armazenada na glândula mamária, no lúmen dos alvéolos secretores e no sistema de ductos até à sua remoção, quer pela amamentação da cria, quer pela ordenha.

O desenvolvimento da glândula mamária na vida pós fetal inicia-se na puberdade, sendo consequência da ação coordenada de várias hormonas (Chavatte-Palmer, 2002). A atividade ovárica cíclica, característica desta fase, faz com que haja produção de estrogénios e progesterona, que juntamente com a hormona de crescimento, com os glicocorticoides e com a prolactina, promovem a proliferação e crescimento dos ductos (Frantz & Wilson, 1985; Klein, 2014).

Ainda que a evolução da glândula se inicie aquando da puberdade, esta permanece relativamente subdesenvolvida, uma vez que o seu grande desenvolvimento estrutural ocorre durante a gestação (Reece, 2006; Klein, 2014). O crescimento mamário é o principal determinante na capacidade de produção de leite, pois o número de células alveolares mamárias influencia diretamente a sua produção (Moraes, 2016).

O início da lactação depende de fatores hormonais, principalmente da secreção de progesterona. O ótimo desenvolvimento da glândula mamária requer a ação coordenada de algumas hormonas incluindo a prolactina, estrogénio, progesterona, esteroides adrenais, insulina e hormonas da tiroide. A ação destas hormonas pode ser direta sobre a produção e secreção de leite, como é o caso da prolactina, estrogénio e progesterona, ou dar-se através de um estímulo ao desenvolvimento da glândula mamária, caso das hormonas da tiroide, esteroides adrenais e insulina (Santos & Zanine, 2006). Com o início da lactação aumenta bastante o metabolismo e o fluxo sanguíneo das glândulas mamárias, enquanto o fluxo sanguíneo do útero diminui após o parto. Deste modo, é assegurado o fornecimento de compostos necessários para a síntese dos constituintes do leite (Kolb, 1907). A prolactina é a hormona principal da lactogénese, sendo libertada devido à ação mecânica no teto, quer por sucção da cria, quer pela ordenha. Estes estímulos são conduzidos para o hipotálamo e a síntese de dopamina, principal inibidor da produção de prolactina na pituitária anterior, é bloqueada, ocorrendo um pico de concentração de prolactina (Klein, 2014). Os recetores de prolactina estão presentes no tecido mamário e aumentam em número durante a gestação e após o parto (Chavatte-Palmer, 2002). Outra hormona importante que atua na glândula mamária é a ocitocina. Tem um papel fundamental na saída do leite, isto porque, imediatamente sobrepostas aos alvéolos, estão as células mioepiteliais que possuem longos processos contráteis, que em resposta à ocitocina sanguínea promovem a contração destes,

e consequente excreção do leite para os ductos e cisternas (Hafez, 1980). Este processo é habitualmente conhecido como a descida do leite (Chavatte-Palmer, 2002) (figura 13).

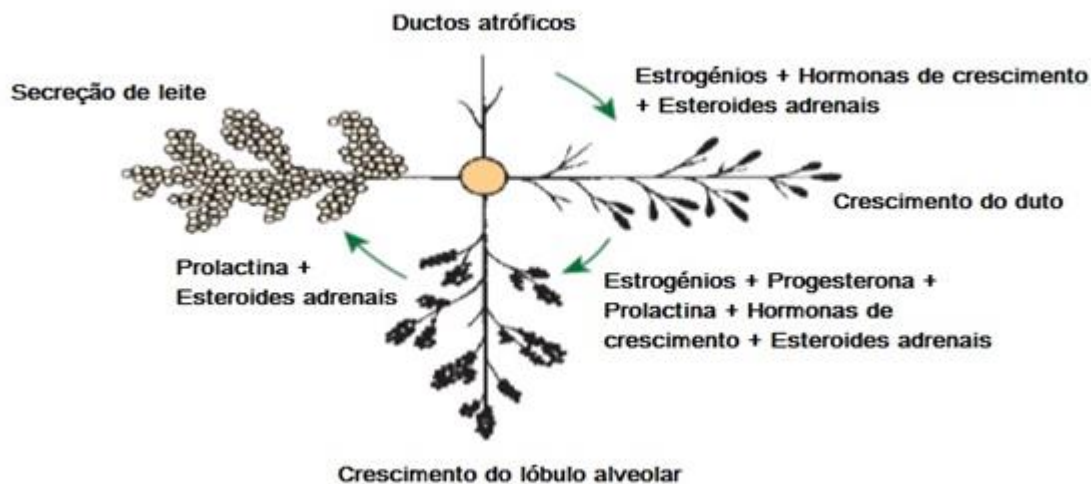


Figura 13. Hormonas envolvidas no crescimento da glândula mamária e no início da secreção de leite. (Adaptada de Klein, 2014)

Na transição da gestação para a lactação, aumenta a ingestão alimentar, isto porque, para que haja uma intensa função das glândulas mamárias, é condição necessária uma alimentação completa qualitativa e quantitativamente. O metabolismo das glândulas mamárias mantém estreita relação com o metabolismo corporal (Kolb, 1907).

4.2. Leite de origem asinina

O reconhecimento das qualidades do leite de burra remonta a tempos antigos. Nessas épocas era um produto bastante utilizado na resolução de vários problemas de saúde, como dores articulares, anemia, cicatrização de feridas, envenenamentos e tuberculose (Leite, Vaitsman, Dutra & Guedes, 2006). Devido à sua riqueza nutricional, era também usado na alimentação de crianças, quer em hospitais, quer em orfanatos. Por esta razão, o Hospital Pediátrico de *Saint-Vincent-de-Paul*, em França, no ano de 1877, edificou um estábulo com burras nas proximidades do dormitório, no sentido de poder, mais facilmente e de forma direta e efetiva, alimentar as crianças internadas. Esta prática durou até ao início do século XX, tendo sido a partir dessa altura substituído pelo leite de vaca, tendo este animal maior capacidade de produção, e coincidindo com o aumento de crianças órfãs, originados pelo início da I Grande Guerra (Chiofalo, Polidori & Vicenzetti, 2015). Para além destas utilidades, o leite de burra mantinha um papel importante na área da cosmética, como preservador da

qualidade da pele. Desde Cleópatra, Rainha do antigo Egito, a Pompeia, mulher do imperador Nero, até Pauline, irmã de Napoleão, que a história da utilização do leite de burra está associada a rituais de beleza (Karatosidi, Marsico & Tarricone, 2013). Hoje em dia é usado principalmente na Ásia, África e Europa Oriental, onde ainda existe a tradição de criar burros (Vincenzetti et al., 2008).

O leite bovino é, de longe, o tipo de leite mais consumido dominando a produção global (Claeys et al., 2014). Para outras espécies de animais como o cavalo e o burro, não há estatísticas mundiais disponíveis, mas sabe-se que a sua contribuição para a produção global é inferior a 0,1% (Faye & Konuspayeva, 2012).

O leite de origem asinina tem chamado bastante à atenção da comunidade científica devido às suas características e composição, tendo sido muito estudado nos últimos anos (Polidori & Vincenzetti, 2012). Contudo a informação acerca do leite de burra ainda é bastante limitada, comparativamente com outras espécies (Guo et al., 2007). Segundo Salimei & Fantuz (2012) os asininos, assim como os restantes equídeos, são animais que produzem relativamente pouca quantidade de leite. A fêmea Asinina é sujeita a duas ou três ordenhas por dia, quando explorada de forma intensiva, e em média produz 740mL de leite por ordenha, contudo entre ordenhas existem variações. A quantidade máxima de leite que se consegue obter é 1,4L e é quando o animal se encontra no pico de lactação (Salimei et al., 2004) (figuras 14 e 15).

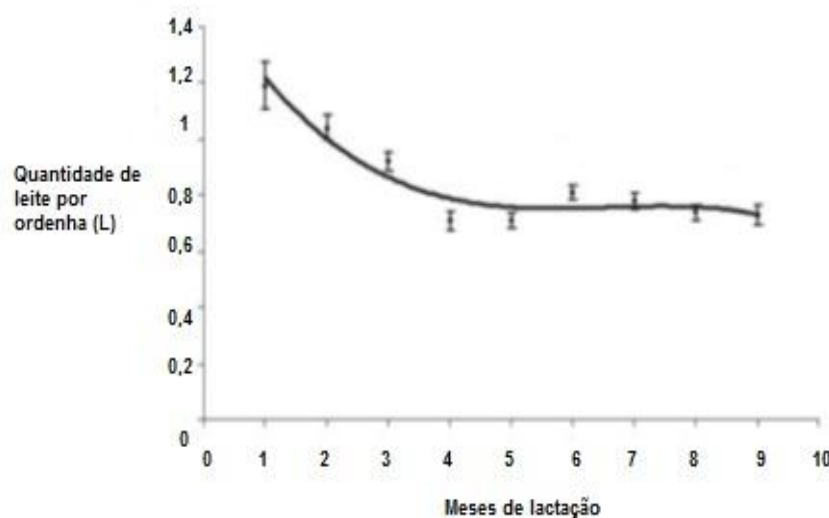


Figura 14. Curva de lactação das burras (Adaptada de Salimei & Fantuz, 2012).

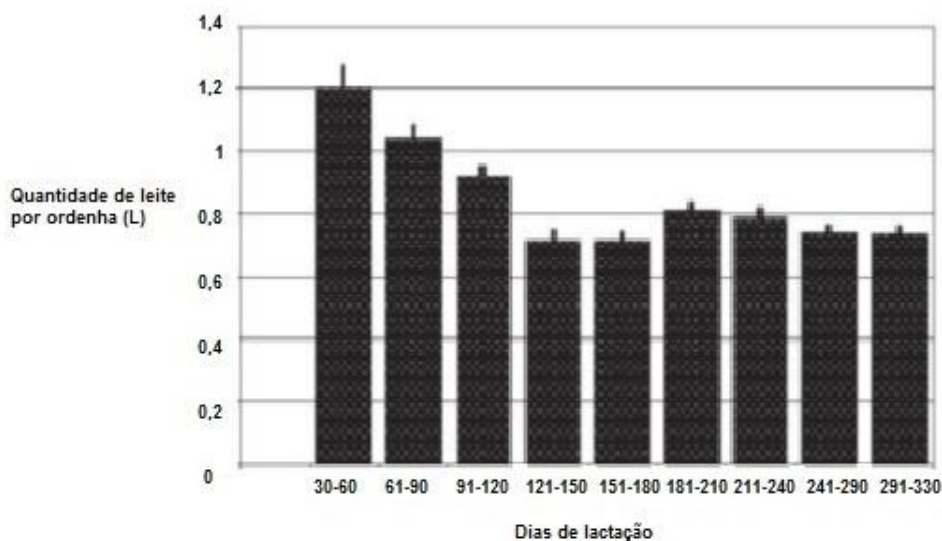


Figura 15. Produção de leite de burra ao longo do período de lactação (Fonte: Salimei, 2011).

Relativamente à sua composição, segundo Criscione et al. (2008) e Polidori & Vincenzetti (2012), o leite de burra apresenta grande semelhança com o leite humano, como podemos verificar na tabela 3. Vincenzetti et al. (2008) consideram o leite de burra uma alternativa válida para a nutrição infantil, e Carroccio et al. (2000) confirmam que a alimentação com leite de origem asinina é uma alternativa segura nos casos de intolerância alimentar múltipla. No entanto, Claeys et al. (2014) defendem que apesar das semelhanças entre o leite humano, de égua, de burra, de cabra ou mesmo leite de outras espécies, não há alternativas viáveis para o leite humano. Para crianças com menos de 1 ano, recomenda-se dar leite humano ou leite artificial. Para as pessoas que sofrem alergia ao leite de vaca, o leite de outros animais pode até ser uma alternativa, no entanto, dada a complexidade da questão, são necessários testes individuais, por exemplo, teste de alérgenos e regulamentação que aprobe a comercialização do produto.

Com a implementação da Política Agrícola Comum, foram aprovadas muitas diretivas destinadas a estabelecer regras sanitárias específicas para a produção e a colocação no mercado, das quais resultam critérios e requisitos dos géneros de origem animal, pela frequente constatação de riscos microbiológicos e químicos, de forma a elevar o nível de proteção de saúde pública. Neste âmbito, foi aprovado o Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril, que, ao estabelecer as regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal, consolidou quais as práticas na obtenção desses géneros, a sua utilização, e se os mesmos são passíveis de ser considerados alimentos. Acresce que, posteriormente, o leite proveniente da burra passou a constar da lista de novos alimentos da

União Europeia. Foi aprovado a 25 de novembro de 2015 o Regulamento (CE) n.º 2283/2015 que estabelece regras para a colocação de novos alimentos no mercado da União. Segundo este, para que o leite de burra possa ser comercializado, é necessário que este seja sujeito a um processo de validação ou que apresente um historial de uma utilização segura num país terceiro durante pelo menos 25 anos no regime alimentar habitual de um número significativo de pessoas.

Tabela 3. Composição e propriedades físicas do leite de burra, de vaca e de Mulher (Adaptado de Guo et al., 2007).

	Burra	Mulher	Vaca
pH	7,0 – 7,2	7,0 – 7,5	6,6 – 6,8
Proteína g/100g	1,5 – 1,8	0,9 – 1,7	3,1 – 3,0
Gordura g/100g	0,3 – 1,8	3,5 – 4,0	3,5 – 3,9
Lactose g/100g	5,8 – 7,4	6,3 – 7,0	4,4 – 4,9
Cinzas g/100g	0,3 – 0,5	0,2 – 0,3	0,7 – 0,8
Sólidos totais g/100g	8,8 – 11,7	11,7 – 12,9	12,5 – 13,0
Caseína g/100g	0,64 – 1,03	0,32 – 0,42	2,46 – 2,80
Proteínas do lactosoro g/100g	0,49 – 0,80	0,68 – 0,83	0,55 – 0,70

O leite de burra, tal como o das outras espécies, é composto essencialmente por água, e é nessa porção que se encontram dispersos os componentes sólidos, denominados sólidos totais. Os sólidos totais são constituídos por proteínas, lípidos, hidratos de carbono como a lactose, sais minerais e vitaminas (Venturini, Sarcinelli & Silva, 2007).

O leite de burra possui, na sua composição, uma fração azotada representada por 15,8 % de azoto não proteico, 36,9% de proteínas do lactosoro e 47,3% de caseína. As proteínas de lactosoro estão distribuídas na percentagem relativa de: 29,85% de β -lactoglobulina, 22,56% de α -lactoalbumina, 6,18% de albumina, 21,03% de lisozima e 4,48% de lactoferrina (Salimei et al., 2004). Relativamente à fração lipídica, esta apresenta uma maior quantidade de ácidos gordos saturados comparativamente com os insaturados, obtendo valores de 55,3 g/100g para os ácidos gordos saturados e 44,7 g/100g de ácidos gordos insaturados. Dos ácidos gordos insaturados 23,1g/100g são monoinsaturados e 21,6 g/100g são polinsaturados (Chiofalo, Miraglia & Martin-Rosset, 2006). Dentro dos ácidos gordos polinsaturados, encontram-se ácidos essenciais como o ácido linoleico e linolénico, com valores médios de 8,15g de ácido linoleico por cada 100g de ácidos gordos polinsaturados, e 6,32g de ácido linolénico por cada 100g de ácidos gordos polinsaturados (Salimei et al., 2004). Acerca da concentração de minerais no leite, este contém 334,61mg/kg de cálcio, 58,46mg/kg de

magnésio, 1,99 mg/kg de zinco, 1,15 mg/kg de ferro, 0,16 mg/kg de cobre, 487mg/kg de fósforo, 497,2 mg/kg de potássio e 218,3 mg/kg de sódio (Salimei et al., 2004; Fantuz, Maglieri, Lebboroni & Salimei, 2009).

O interesse na pesquisa e o investimento de capital no leite de burra na Europa aumentaram, não só pela sua semelhança com o leite humano como já foi referido anteriormente, mas também pelo seu potencial como matéria-prima para a produção de produtos de cosmética (Carroccio et al., 2000; Salimei & Fantuz, 2010). Relativamente à sua utilização na indústria da cosmética, o leite de origem asinina é considerado um importante ingrediente devido à sua fração lipídica, em especial devido ao seu grande conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, e à sua fração proteica, na medida em que é rico em proteínas do lactosoro (alfa-lactoalbuminas e beta-lactoglobulinas), apresentando estas uma ação ativa na hidratação da pele, e contribuindo para o desenvolvimento natural de uma pele renovada prevenindo assim o envelhecimento (Secchi, 2008; Gorouhi & Maibach, 2009; Salimei & Fantuz, 2012).

Com o aumento da procura de produtos de cosmética que contêm leite de burra na sua composição, o nosso ordenamento jurídico sentiu necessidade de transpor as diretivas comunitárias por forma a regulamentar o regime aplicável a produtos cosméticos e de higiene corporal. O Decreto-Lei n.º 189/2008 de 24 setembro, surge nesse âmbito prevendo o regime jurídico dos designados produtos cosméticos, sendo este o normativo que regulamenta a comercialização dos produtos obtidos da transformação do leite de burra em pó que depois é adicionado aos cosméticos.

4.3. Microrganismos frequentes do leite cru

O leite apresenta uma grande disponibilidade de nutrientes, um pH próximo da neutralidade e uma grande atividade da água, o que o torna um meio extremamente favorável ao crescimento microbiano (Souza, Nogueira & Nunes 1995; Arcuri et al., 2006). Para as indústrias que o usam como matéria-prima, o valor microbiano é inevitavelmente um fator importante, sejam elas direcionadas para a cosmética ou para o consumo humano.

Dependendo da origem e do grau de contaminação, a flora bacteriana do leite pode variar consideravelmente em número e em espécie (Lafarge et al., 2004). A contaminação do leite pode ocorrer por duas vias: endógena, a partir da glândula mamária, e exógena após a saída do úbere, através da superfície dos tetos e do úbere, do manuseamento, dos equipamentos da ordenha e do seu armazenamento (Santos & Fonseca, 2001; Tronco, 2010). A microbiota predominante no leite cru (tabela 4) inclui geralmente espécies de bactérias do ácido láctico (*Lactococcus*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc*, *Enterococcus* ou *Streptococcus*

spp.), *Pseudomonas* spp., bactérias pertencentes à família *Micrococcaceae* (*Micrococcus* e *Staphylococcus* spp.) e leveduras. Outros grupos microbianos presentes no leite cru incluem *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria* spp. e enterobactérias. Há ainda muitas espécies como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* e *Aeromonas*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium* e *Propionibacterium* (Lafarge et al., 2004). Da família *Enterobacteriaceae* fazem parte os gêneros: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* e *Yersinia*. Estes microrganismos são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e sensíveis à alta temperatura, sendo destruídos na pasteurização do leite. Em condições favoráveis, a *E. coli* pode alterar as características do leite, uma vez que fermenta a lactose e outros carboidratos produzindo ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, e hidrogênio, e é indicadora de contaminação fecal (Franco & Landgraf, 2003; Murray, Rosenthal & Pfaller, 2014). Outra família de bactérias que faz parte da microbiota do leite é a *Micrococcaceae* que tem como principais representantes os *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., que são cocos gram positivos, geralmente imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos. O *Micrococcus varians* é um contaminante não patogênico muito comum no leite (Tebaldi, Oliveira, Boari & Piccoli, 2008). *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* são cocos gram positivos, anaeróbios facultativos, membros da família *Streptococcaceae* e comumente encontrados no leite. *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus agalactiae* têm sido encontrados no leite e no tecido mamário de animais com mamite (Jay, Loessner & Golden, 2005). *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. são bacilos gram positivos esporulados, termorresistentes, aeróbios e anaeróbios, respectivamente. A presença de *Bacillus cereus* é uma das maiores preocupações da indústria de laticínios, visto tratar-se de um microrganismo termodúrico que pode apresentar atividade lipolítica e proteolítica, comprometendo a qualidade de produtos lácteos (Rezende-Lago, Rossi, Vidal-Martins & Amaral, 2007; Watanuki & Gallo, 2008). As leveduras não são encontradas com frequência, pois o seu desenvolvimento no leite durante o armazenamento refrigerado é limitado e são rapidamente inibidas por bactérias psicotróficas (Menezes et al., 2014).

De acordo com a temperatura de crescimento, os microrganismos contaminantes do leite podem ser divididos em três grupos principais: os mesófilos que se multiplicam idealmente entre os 25 e os 40°C, os termófilos que possuem uma temperatura ótima de multiplicação entre os 45 e os 65°C, e os psicotróficos que têm a capacidade de se desenvolver a temperaturas inferiores a 7°C, sendo estes considerados os indicadores ideais para a avaliação da qualidade microbiológica do leite refrigerado, uma vez que a temperatura de refrigeração, 4°C, não é suficiente para controlar o seu crescimento (Walter de Santana et al., 2001; Ordoñez, 2004). A proliferação das bactérias está sob influência da carga microbiana inicial e da temperatura de refrigeração durante o armazenamento. As baixas

temperaturas inibem a multiplicação dos microrganismos mesófilos, no entanto, e em contrapartida, as bactérias psicrotróficas, em especial as aeróbias gram negativas, como as *Pseudomonas spp.* que são os principais responsáveis pela deteriorização do leite refrigerado, podem proliferar resultando numa diminuição da qualidade dos produtos lácteos (Nornberg, Tondo & Brandelli, 2009). A ação deteriorante das bactérias psicrotróficas deve-se, principalmente, à produção de proteases, lípases e fosfolipases, que hidrolisam, respetivamente, a proteína e a gordura do leite. A maioria destas bactérias não sobrevive à pasteurização, porém, muitas das suas enzimas hidrolíticas são termorresistentes, podendo resistir ao tratamento de pasteurização ultrarrápida (*Ultra High Temperature* - UHT) (Arcuri et al., 2008).

Contudo, nem todos os microrganismos causam deteriorização do leite, existem alguns microrganismos conhecidos como bactérias lácticas, como as do género *Lactobacillus*, que produzem um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, e transformam os nutrientes fundamentais do leite em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (Lima, Lima, Cerqueira, Ferreira & Rosa, 2009).

A temperatura e o período de armazenamento do leite antes da pasteurização têm um papel fundamental na multiplicação dos microrganismos e consequentemente na contagem microbiana total. O leite quando é obtido por ordenha mecânica e refrigerado a 4°C apresenta uma boa qualidade microbiológica quando comparado com os padrões internacionais exigidos. A obtenção do leite de animais saudáveis, em condições higiénicas adequadas, e o seu arrefecimento imediato são medidas fundamentais para garantir a qualidade e segurança do leite (Arcuri et al., 2006).

Neste âmbito, o leite de burra, comparando com outras espécies, apresenta um grande efeito inibitório contra diversas espécies bacterianas e um baixo conteúdo microbiano na análise da flora microbiológica do leite cru. Estas características são atribuídas à presença de substâncias antimicrobianas naturais, principalmente à alta concentração de lisozima que se encontra num valor médio de 1mg/mL (Vincenzetti et al., 2008; Zhang, Zhao, Jiang, Dong & Ren, 2008; Salimei & Fantuz, 2010). Segundo Vincenzetti et al. (2008) a lisozima é conhecida por ser um agente antimicrobiano natural uma vez que catalisa a hidrólise das ligações glicosídeas de polissacáridos das paredes celulares bacterianas.

Tabela 4. Contagem microbiana em amostras de leite cru de origem asinina (Adaptada de Coppola et al., 2002).

Grupo Microbiológico	Log ufc/mL (\pm desvio padrão)
Contagem Total	4,6 \pm 0,6
Bactérias psicotróficas	1,5 \pm 0,2
Leveduras e bolores	4,5 \pm 0,8
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,2 \pm 0,6
Coliformes totais	1,4 \pm 0,2
Coliformes fecais	1 \pm 0,3
<i>Lactobacillus</i>	1,6 \pm 0,7
<i>Enterococcus</i>	1,5 \pm 0,6
<i>Lactococcus</i>	3,2 \pm 1,1

5. Pasteurização

A preservação de alimentos é crucial quando se fala de higiene e segurança alimentar. Cada tratamento de preservação tem o objetivo de atrasar a inevitável alteração dos alimentos rapidamente perecíveis entre a produção e o consumo. Os métodos de preservação de alimentos implicam a criação de condições desfavoráveis para o desenvolvimento e atividade de vários agentes patogênicos, microrganismos deteriorantes e outras formas de vida (Micali, Fiorino & Parisi, 2016). A história da eliminação dos microrganismos nos alimentos preparados iniciou-se com Nicholas Appert, um confeitoiro francês que colocou alimentos em garrafas de vidro com rolha, aquecendo-as em água a ferver. Com esta experiência verificou que a maioria dos alimentos assim tratados não se deteriorou, anunciando a sua descoberta em 1810. Naquela época a microbiologia era desconhecida e Appert foi incapaz de explicar a eficácia do seu método. Ele acreditava que, com a combinação do calor e a privação do ar prevenia a decomposição dos alimentos. Cinquenta anos depois, Louis Pasteur demonstrou que certos microrganismos são responsáveis pela fermentação e decomposição dos alimentos (Gould, 1995). Louis Pasteur foi o primeiro cientista a compreender o papel dos microrganismos nos alimentos, estabelecendo a relação destes com o processo de fermentação do vinho. Na procura de uma solução para um problema dos viticultores de uma região de França – a acidificação dos vinhos armazenados – relacionou essa deterioração com a contaminação por bactérias. Pasteur descobriu que, aquecendo o vinho a uma temperatura de 56°C, os organismos que alteravam o gosto do vinho eram eliminados. Esse

processo ficou conhecido como pasteurização, ainda hoje largamente utilizado na indústria de alimentos, principalmente como processo de conservação do leite (Nóbrega & Bossolan, 2010). A pasteurização é necessária por dois motivos, pela preservação da saúde pública, uma vez que protege o consumidor de possíveis infecções eliminando todas as bactérias patogénicas, e pela necessidade de se prolongar a vida útil dos produtos, pois elimina as bactérias e enzimas deteriorantes.

A pasteurização é definida, pela comissão do *Codex Alimentarius* cujos padrões são elaborados por órgãos internacionais independentes de avaliação de riscos organizados pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), e pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como um processo aplicado com o objetivo de reduzir ao mínimo os possíveis perigos para a saúde, provenientes dos microrganismos patogénicos associados ao leite, mediante tratamento térmico que provoque as mínimas alterações químicas, físicas e organoléticas do produto. Ainda que não destrua todos os potenciais organismos patogénicos presentes, reduz o seu número a um nível que não constitua um perigo notável para a saúde (FAO, 2000).

5.1. Tipos de pasteurização

Após as descobertas de Pasteur sobre a pasteurização em 1863, foram experimentadas diversas combinações tempo-temperatura de aquecimento durante o processo de pasteurização do leite. Através destas experiências chegaram às condições de tempo-temperatura suficientes para destruir o maior número possível de microrganismos nocivos à saúde, sem modificar significativamente as propriedades e a composição do leite. As condições dos diversos processos de aquecimento do leite foram estabelecidas tendo em conta um dos agentes patogénicos mais resistentes à temperatura, a *Coxiella burnetti*. Com os resultados obtidos chegaram aos atuais binómios tempo-temperatura (Pelczar & Chan, 1981; Rocha, 2004). Existem três tipos de pasteurização:

Pasteurização lenta ou *Low Temperature Long Time* (LTLT): segundo o Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril, este procedimento implica o aquecimento do leite a uma temperatura baixa durante um longo período, pelo menos 63°C durante 30 minutos, de modo a que os produtos mostrem, se for o caso, uma reação negativa a um teste à fosfatase alcalina imediatamente após tal tratamento. A rapidez de arrefecimento é importante para evitar o aumento de bactérias. Durante o tempo de aquecimento, o leite deve ser agitado para evitar aderências às paredes do recipiente, promover um aquecimento uniforme de todas as suas partículas e, ao mesmo tempo, evitar a formação de espuma. Este método é conhecido como o método de tanque, requer equipamentos de baixo custo e de fácil operação e manutenção,

sendo habitualmente usado em pequenas escalas de produção, pelos pequenos produtores e pelas pequenas indústrias. Apresenta, contudo, a desvantagem de ser um processo demorado, descontínuo, com operação manual e com possibilidade de desenvolver microbiota termófila na espuma (Leite et al., 2006; Andrade, Souza, Penna, Ferreira, 2008).

Pasteurização rápida ou *High Temperature and Short Time* (HTST): é atualmente o método mais utilizado pela maioria das indústrias e, segundo o Regulamento (CE) n.º 853/2004 de 29 de abril, consiste no aquecimento do leite a uma temperatura elevada durante um curto período, pelo menos 72°C durante 15 segundos, de modo a que os produtos mostrem, se for o caso, uma reação negativa a um teste à fosfatase alcalina imediatamente após tal tratamento (Tamime, 2009). A grande maioria dos pasteurizadores HTST usam permutadores de calor tipo placa com secções para aquecimento e arrefecimento regenerativos (Rahman, 2007) (figura 16). Os permutadores são o núcleo central de um sistema de pasteurização, constituindo um sistema físico que permite transferir calor entre dois fluidos separados por uma parede sólida, não havendo mistura entre eles. Os permutadores de calor tipo placa são compostos por placas de aço inoxidável com espessura de 0,6 a 0,8mm. Cada par de placas adjacentes forma um canal e os fluidos circulam por canais alternativos, ficando a placa em contacto com os dois fluidos (Fellows, 2000; Marquez, 2007). A troca de calor ocorre de forma uniforme, enquanto os microrganismos tendem a aderir às superfícies, o chamado efeito de parede (Micali et al., 2016). A circulação alternada do leite pelas placas em camadas extremamente delgadas, faz com que a troca de calor seja muito rápida e eficiente, de modo que a unidade de retardamento, na qual o leite permanece pelo tempo necessário à temperatura de processamento, não necessite ser excessivamente grande, permitindo um fluxo contínuo e um procedimento industrial rápido que pode ser adequado a diferentes quantidades de leite (Prata, 2001; Almeida, 2006). Este tipo de permutador oferece assim grandes vantagens, como fácil higienização, alta eficiência térmica, turbulência baixa no escoamento, viabilidade económica e uma boa distribuição da temperatura (Yamashita, Aguiar & Gut, 2009).

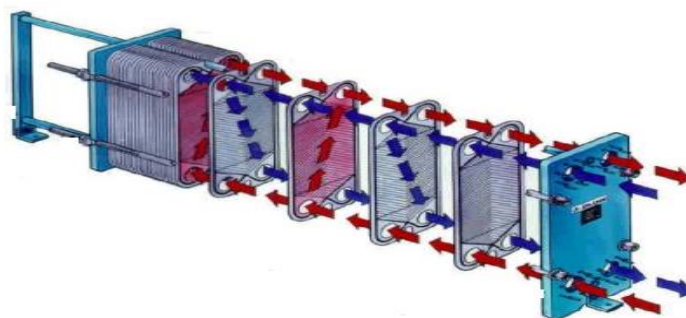


Figura 16. Circulação dos fluidos no permutador de placas (Disponível *online* em: <http://www.nibleyco.com/apv-heat-exchangers/>).

Pasteurização ultrarrápida ou *Ultra High Temperature* (UHT): segundo o Regulamento (CE) 853/2004 de 29 de abril, este tipo de pasteurização implica um aquecimento em fluxo contínuo a alta temperatura durante um curto período de tempo, não inferior a 135°C em combinação com um tempo de retenção adequado, de maneira a que nenhum microrganismo ou esporo sejam capazes de crescer no produto tratado, mantido num recipiente asséptico fechado a temperatura ambiente, e suficiente para assegurar que os produtos se mantêm estáveis do ponto de vista microbiológico depois de incubarem durante 15 dias a 30°C em recipientes fechados, ou durante 7 dias a 55°C em recipientes fechados, ou depois de submetidos a qualquer outro método que demonstre que foi aplicado o tratamento térmico adequado.

O processo UHT envolve as seguintes etapas: pré-aquecimento com regeneração de calor, manutenção à temperatura de pré-aquecimento, aquecimento até à temperatura de esterilização, manutenção à temperatura de esterilização, arrefecimento e embalagem asséptica. Além disso, a homogeneização é geralmente incluída antes ou depois da etapa de manutenção à temperatura de esterilização (Tamime, 2009).

O método UHT difere da esterilização clássica porque, enquanto o UHT atinge rapidamente altas temperaturas num curto período de tempo, a esterilização atinge altas temperaturas num longo período de tempo, pelo menos 120°C em 15 minutos (Micali et al., 2016). O processamento UHT de leite combinado com embalagens assépticas foi introduzido para produzir um produto estável em prateleira com danos químicos mínimos em comparação com o leite esterilizado no recipiente (Tamime, 2009). A UHT destrói microrganismos, tendo impacto na flora vegetativa e esporulada, resistindo apenas os esporulados termorresistentes, e preserva vitaminas e nutrientes. Na ausência de atividade bacteriana e com a pré-esterilização da embalagem, o leite torna-se menos perecível, e através da ultrapasteurização o período de validade do leite é prolongado sem adição de conservantes (Albalact, 2015).

Existem dois métodos principais de tratamento UHT:

- Sistemas de aquecimento direto - o produto é aquecido por contacto direto com vapor de alta qualidade. A principal vantagem do aquecimento direto é o produto ser mantido a uma temperatura elevada por um período de tempo mais curto. O pouco tempo de contacto explica, aparentemente, a ausência de danos sérios, do ponto de vista sensorial (Datta, Elliot, Perkins & Deeth, 2002). Existem dois principais tipos de sistemas de aquecimento direto de UHT conhecidos, a injeção de vapor (vapor de leite) e infusão de vapor (leite em vapor). No primeiro, o vapor superaquecido é injetado num fluxo de leite, enquanto que no último, o leite é pulverizado ou deixado cair numa câmara de vapor superaquecida. Uma característica importante destes dois sistemas é o aumento, quase instantâneo, da temperatura do leite do pré-aquecimento para a temperatura de esterilização, através da transferência do calor latente de vaporização do vapor para o leite. Durante esta fase de aquecimento, o vapor é condensado e o leite é diluído com água. O grau de diluição depende do aumento de temperatura do leite (Lewis & Heppell, 2000). Após a passagem do leite através do tubo de retenção de calor, a água arrastada é removida na câmara de vácuo, que também arrefece rapidamente o leite até aproximadamente à mesma temperatura que a do leite pré-aquecido. Se o vapor utilizado for de má qualidade pode levar a alterações no sabor do leite (Burton, 1994);

- Sistema de aquecimento indireto – o meio de aquecimento e o produto não estão em contato direto. De uma maneira geral, os fluidos são forçados a passar por placas próximas do permutador de calor. É importante realçar que a energia térmica é difundida da zona externa das câmaras UHT para o núcleo interno. Como consequência, as áreas externas dos fluidos podem ser superaquecidas com possíveis alterações, por exemplo, o sabor a cozido (Corzo, Lopez-Fandiño, Delgado, Ramos & Olano, 1994; Tamime, 2009).

A pasteurização do leite, de forma sistemática e obrigatória, contribui e reforça a segurança no aspeto sanitário, sendo um importante recurso industrial, uma vez que a maioria dos organismos patogénicos não resiste ao binómio tempo - temperatura a que este é processado (Prata, 2001). As temperaturas de pasteurização utilizadas para cada alimento devem ser suficientes para destruir os microrganismos não formadores de esporos, inclusive os de maior resistência térmica como o *Micobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetti*, além de todas as leveduras, bolores, bactérias gram-negativas e muitas gram-positivas. Os microrganismos sobreviventes são os termófilos e os termodúricos que são representados pelos géneros *Lactobacillus* e *Streptococcus* (Teixeira de Carvalho, 2013).

A esterilização, por sua vez, significa a destruição de todas as células vegetativas e esporuladas. Em alimentos, emprega-se o termo esterilização comercial para indicar que nenhum microrganismo viável pode ser detetado pelos métodos usuais de sementeira, ou

ainda, que o número de sobreviventes é tão baixo que nessas condições de embalagem e armazenamento é insignificante. Para isso contribuem também o pH, o oxigénio e a temperatura de armazenamento (Teixeira de Carvalho, 2013).

5.2. Alterações provocadas pela pasteurização no leite

O alimento líquido mais importante é o leite e, por isso, o efeito da pasteurização nos nutrientes deste recebe uma atenção considerável (Rahman, 2007). O leite é considerado uma matriz biológica complexa com proteínas, lípidos, hidratos de carbono, sais, vitaminas e enzimas, e é um sistema relativamente estável ao calor em relação a outros alimentos. Dependendo da intensidade do tratamento térmico, o aquecimento pode provocar alterações biológicas e físico-químicas, alterando as suas propriedades nutricionais, organoléticas e tecnológicas. Apesar destas alterações serem normalmente insignificantes quando a temperatura não ultrapassa os 60°C, a aplicação do calor como método de conservação necessita de um rigoroso controlo sob pena de destruir o alimento, ao invés de contribuir para a sua conservação (Walstra & Jenness, 1984; Silva, 2000; Andrade et al., 2008).

Em relação às proteínas, são provavelmente os constituintes mais afetados pelo calor, no entanto não sofrem alterações significativas na sua qualidade (Fox, Uniacke-Lowe, McSweeney, O'Mahony, 2015; Lucey, 2015). A desnaturação é um dos processos que ocorre com a ação térmica e pode ser descrito como qualquer alteração no estado nativo da proteína que não afeta a sua estrutura primária (Tamime, 2009). Esta ocorre na maioria das imunoglobulinas, nas proteínas do soro e nas enzimas. A desnaturação térmica das enzimas do leite tem um papel relevante em dois pontos principais: na estabilidade dos produtos lácteos, na medida em que a inativação da lipase lipoproteica previne a rancidez hidrolítica, o chamado sabor a ranço, e no controlo dos diferentes tratamentos térmicos, como por exemplo, a fosfatase alcalina que é uma enzima naturalmente presente no leite cru, e deve ser desnaturada durante o processo de pasteurização, sendo por isso usada como indicador de uma pasteurização adequada do leite (temperaturas entre 62 a 75°C); a enzima lactoperoxidase também presente no leite cru é usada como indicador da intensidade do tratamento térmico dado ao leite, não sendo destruída pela pasteurização lenta ou rápida, mas sim a temperaturas mais elevadas (75 a 82°C) (Tamime, 2009; Fox et al., 2015). Relativamente à atividade da plasmina, esta aumenta através da eliminação dos seus inibidores, enquanto as caseínas são bastante termoestáveis. Em conclusão, a evidência científica indica que o aquecimento do leite modifica a estrutura das suas proteínas, ainda que não tenha efeito significativo sobre sua digestibilidade e propriedades nutricionais, uma vez

que as alterações nas proteínas estão relacionadas com as suas propriedades funcionais, como a solubilidade e a emulsificação (Póvoa & Moraes-Santos, 1997; Claeys et al., 2013).

Relativamente às vitaminas presentes no leite, algumas são sensíveis ao calor e à luz. Em geral, as perdas de vitaminas são inferiores a 10% durante a pasteurização LTLT e HTST. Já no UHT, apesar de este método aumentar substancialmente a vida útil do leite, aumenta também as perdas entre 10 a 20% de algumas vitaminas, particularmente B6, B9 e B12, bem como a vitamina C (Caballero, Finglas & Touladrá, 2016). A pasteurização não altera a concentração de riboflavina (B2) que é muito estável ao calor, ou vitaminas lipossolúveis como a vitamina A ou E. Outros fatores como o tipo de material da embalagem, exposição à luz, e tempo/temperatura de armazenamento têm um impacto muito maior sobre a perda de vitaminas no leite (Claeys et al., 2013).

No que diz respeito aos minerais, o leite é uma fonte particularmente boa de iodo, cálcio e fósforo. Vários estudos demonstraram que não há impacto da pasteurização no conteúdo e na biodisponibilidade mineral do leite (Weeks & King, 1985; Zurera-Cosano, Moreno-Rojas, Amaro-Lopez, 1994).

As condições normais de pasteurização usadas no leite não têm efeito significativo sobre a lactose (Veisseyre, 1988). A reação de coloração, chamada de reação de *Maillard*, ocorre entre a lactose e a proteína no leite, produzindo sabor e cor indesejáveis e diminuindo o conteúdo disponível do aminoácido lisina na proteína do leite. A reação de isomerização é um rearranjo molecular da lactose em lactulose (Milk Facts, 2017). As principais implicações da reação de *Maillard* nos alimentos e nos sistemas biológicos são muito diversas e afetam aspetos químicos, organoléticos, nutricionais, toxicológicos e manifestações *in vivo*. Os aspetos químicos estão relacionados com o mecanismo da reação, com o isolamento e identificação dos produtos intermediários, e com a estrutura e propriedades dos produtos finais (melanoidinas). Os aspetos organoléticos dizem respeito ao desenvolvimento de aromas e sabores, à modificação de propriedades físico-químicas e ao controlo do fenómeno de escurecimento. Os aspetos nutricionais consideram, essencialmente, a perda de aminoácidos (lisina, arginina, etc.) e de valor nutritivo das fontes de proteína. Os aspetos toxicológicos estão estreitamente relacionados com a formação de mutagénicos e de antimutagénicos (Nunes & Baptista, 2001).

Os lípidos estão entre os constituintes do leite que menos sofrem alterações com o tratamento térmico. A degradação térmica dos lípidos no leite geralmente não é observada, uma vez que a temperatura necessária para a sua decomposição é superior a 200°C, e esta não é usada, normalmente, no aquecimento dos produtos lácteos (Tamime, 2009).

Em conclusão, a pasteurização HTST e LTLT causam poucas alterações na cor, sabor, aroma e aparência no leite, e nenhuma redução significativa no valor nutricional, embora

alguns devotos de leite cru contestem estes factos (Tamime, 2009). Relativamente ao sabor, podem até estabilizá-lo pela redução de enzimas como as lipases, caso não as elimine totalmente (Fox & McSweeney, 1998). Quanto à cor, a diferença entre a brancura do leite cru e a do leite pasteurizado é devido à homogeneização, e a pasteurização LTST e HTST não têm efeito mensurável (Rahman, 2007). Na pasteurização UHT o leite apresenta maiores alterações após o tratamento. O tamanho e a desnaturação das proteínas do soro aumentam a quantidade de dispersão de luz e o leite parece mais branco. O leite UHT é invariavelmente homogeneizado e, portanto, mais branco. No entanto, esta melhoria é equilibrada pelo acastanhamento, o que diminui o grau de reflectância e dá uma cor branca suave (Hardik & Atanu, 2017). Relativamente ao sabor, o leite UHT logo após o processo tem um sabor sulfuroso, que vai diminuindo ao longo do armazenamento. O sabor a cozido proveniente da reação de *Maillard* também contribui para o sabor global do leite UHT. No que se refere às características nutritivas, há poucas alterações significativas nas proteínas, minerais e vitaminas durante o processo térmico (tabela 5) (Ordoñez, 2004).

Tabela 5. Representação em percentagem da perda de alguns nutrientes no leite tratado com pasteurização rápida (HTST) e ultrarrápida (UHT). (Adaptada de Hardik & Atanu, 2017)

NUTRIENTES	PERDA DE NUTRIENTES (%)	
	LEITE HTST	LEITE UHT
Ácido ascórbico	10-25%	15-25%
Ácido Fólico	0-12%	10-20%
Vitamina B₁₂	0<10%	0-30%
Vitamina B₆	0<10%	0-10%
Riboflavina	0<1%	0-10%
Tiamina	0-10%	<10-18%
Niacina	Sem perdas	<10%
Ácido Pantoténico	Sem perdas	Sem perdas
Vitamina A	Sem perdas significativas	Sem perdas significativas
Proteínas e Aminoácidos	Sem perdas significativas	Sem perdas significativas
Minerais e oligoelementos	Sem variações consideráveis no cálcio	Variações consideráveis no cálcio

6. Tecnologias emergentes

Os consumidores estão cada vez mais conscientes dos riscos e benefícios para a saúde associados ao consumo de alimentos. As alterações nos hábitos alimentares e a crescente demanda de produtos de maior qualidade fez com que se tornasse fundamental a procura de tecnologias alternativas no processamento de alimentos. Para atender às expectativas, a indústria alimentar está a investir recursos e conhecimentos consideráveis de maneira a produzir alimentos ainda mais saudáveis e seguros. Considerando as novas tecnologias emergentes podemos, de forma simplista, dividi-las em térmicas e não térmicas. Na primeira categoria destacam-se, entre outras, o aquecimento óhmico (OH) e micro-ondas, enquanto o tratamento por altas-pressões, pulsos elétricos e radiação ultravioleta se enquadram nos processamentos não térmicos (Lado & Yousef, 2002; Castro, 2008; Alzamora, Welti Chanes, Guerrero & Gómez 2012).

O aquecimento óhmico, também designado aquecimento por efeito de Joule, é um processo em que a corrente elétrica passa através dos alimentos com o objetivo de os aquecer. A resistência que o produto oferece à passagem da corrente elétrica permite a geração interna de energia, dissipada sob a forma de calor, que faz com que esta tecnologia não esteja dependente de fenómenos de transferência de calor a partir de uma fonte externa (Pereira, Rodrigues, Teixeira & Vicente, 2015). Como principais vantagens associadas a este processamento referem-se: a ausência de superfícies para transferência de calor, o aquecimento rápido e uniforme, a baixa velocidade a que circula o fluido tornando-o ideal para alimentos sensíveis ao *stress* mecânico, a redução significativa do processo de *fouling* quando comparado com os processamentos tradicionais, o controlo simples e de baixo custo de manutenção, a grande eficiência energética que se traduz em poupanças significativas de energia, e o facto de ser uma tecnologia com baixo impacte ambiental (Castro, 2008). Entende-se por *fouling* o declínio progressivo na eficiência de inativação com o tempo, devido ao acúmulo de depósitos sobre a superfície de transferência (Guedes et al., 2009). Em contrapartida, o aquecimento óhmico depende das propriedades elétricas e da composição do alimento a ser tratado o aquecimento dos eléctrodos pode ser desigual e pode ocorrer a corrosão e contaminação com metais (Ramaswamy, Sastry & Abdelrahim, 2014). A aplicabilidade desta tecnologia em alimentos ficou sobretudo conhecida no século XX, no entanto, a falta de conhecimento de princípios fundamentais e tecnológicos, assim como elevados custos operacionais, limitaram o seu desenvolvimento e aplicação (Pereira et al., 2015).

Outra das tecnologias emergentes é o aquecimento por micro-ondas. Este é também conhecido por aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a

transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro é chamado de rotação de dipolo, e resulta da relação do alinhamento das moléculas com o campo elétrico aplicado. Quando o campo é removido, as moléculas voltam a um estado desordenado, e a energia que foi absorvida é dissipada na forma de calor. O segundo mecanismo é designado de condução iônica, onde, sob a ação de um campo eletromagnético, ocorre a migração de iões, gerando calor por fricção (Sanseverino, 2001). Apesar das limitações desta tecnologia, o uso da energia de micro-ondas apresenta vantagens na descontaminação de utensílios e no tempo de processamento, diminuindo os custos energéticos e dispensando a utilização de produtos químicos comumente utilizados em alguns métodos convencionais. Todos esses motivos tornam esta tecnologia viável e competitiva, economicamente e ambientalmente, para ser implementada em sistemas industriais, desde que sejam revistas as suas limitações, como por exemplo, a falta de uniformidade na distribuição do aquecimento em sistemas sem controlo de temperatura e potência (Cáceres de Menezes et al., 2014).

A alta pressão hidrostática é uma tecnologia emergente que tem suscitado bastante interesse nas últimas décadas. Neste processamento, os alimentos são expostos, embalados ou a granel, a pressões entre 100 e 800 MPa seguido ou não de um aumento de temperatura (Food and Drug Administration [FDA], 2011). A tecnologia de alta pressão hidrostática apresenta diversas vantagens relativamente aos métodos térmicos tradicionalmente utilizados, tais como: não deteriora os compostos de sabor e cor, evita perdas nutricionais, permite uma aplicação uniforme da alta pressão no alimento e pode ser realizada a temperaturas entre os -20 °C e os 60 °C, o que permite o processamento de alimentos sem recorrer a altas temperaturas (Coelho, 2002; Fellows, 2000). Trata-se de uma tecnologia de baixo consumo energético uma vez que só é necessário fornecer energia durante a compressão, sendo um tratamento que pode ser usado em combinação com os outros tipos de processamento (Fellows, 2000). Para além desta aplicação mais generalizada na área alimentar, a tecnologia de alta pressão também tem sido utilizada noutras áreas, que incluem a biotecnologia e a engenharia de materiais, contudo os custos envolvidos na aquisição dos equipamentos e do processamento tornam o seu uso limitado (Mathias et al., 2010; Saraiva, Delgadillo & Silva, 2015).

Uma tecnologia de inativação não térmica que tem ganho interesse comercial e que tem evoluído cada vez mais, é a tecnologia de campo elétrico pulsado ou *pulsed electric field* (PEF). A tecnologia PEF é baseada numa potência pulsátil aplicada a um produto colocado entre um conjunto de eléctrodos. A destruição de microrganismos é realizada pela aplicação de pulsos curtos de alta tensão, causando a rutura das membranas celulares microbianas. O equipamento PEF industrial é, no momento, raro, caro e com capacidade limitada (Devlieghere et al., 2004).

O tratamento com radiação ultravioleta é outra tecnologia emergente que tem sido bastante estudada devido à sua eficiência na inativação microbiológica na água e em superfícies de diversos materiais (López-Malo & Palou, 2005). Este processamento alimentar é devidamente abordado no próximo tema.

7. A Luz

A luz é uma forma de energia eletromagnética que consiste numa combinação de um campo elétrico e de um campo magnético que se propaga através do espaço transportando energia. No entanto, existem alguns tipos de sólidos chamados de opacos, que não deixam atravessar a luz. Ao longo dos anos muitos cientistas procuraram respostas para esta questão, surgindo duas teorias que são atualmente válidas, uma vez que a luz se pode comportar como uma onda, ou como uma partícula. A teoria corpuscular da luz defende que a luz é constituída por pequenas partículas denominadas fótons; e a teoria ondulatória da luz, considera que esta é uma manifestação de energia, constituída por ondas semelhantes às do som, mas com comprimentos de onda muito menores. Ao intervalo completo da radiação eletromagnética, que contém as ondas rádio, o infravermelho, a luz visível, os raios ultravioleta, os raios X e a radiação gama, dá-se o nome de espectro eletromagnético (figura 17) (Villate, 2005; Bolton & Cotton, 2008).

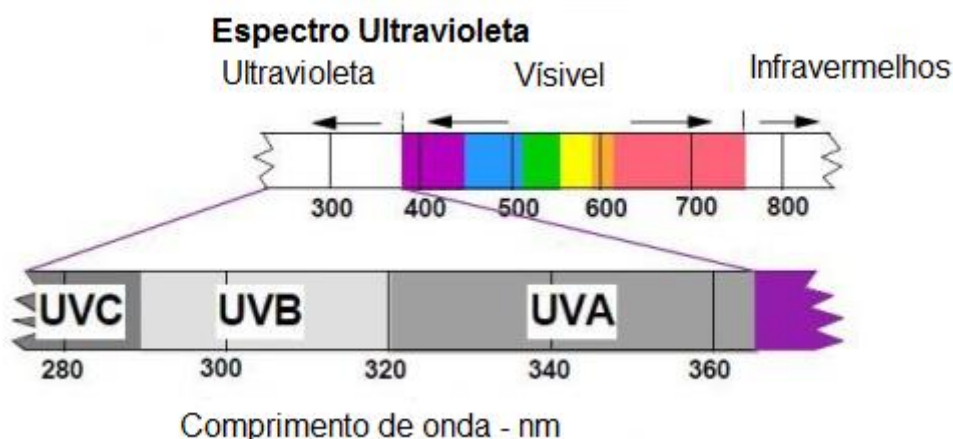


Figura 17. Espectro electromagnético (Adaptado de UV-B Monitoring and research program, Colorado State University).

7.1. Radiação ultravioleta

A história da radiação ultravioleta começa com Isaac Newton e os seus contemporâneos. Em 1672, Isaac Newton publicou uma série de experiências com prismas que separaram a luz solar nas suas cores constituintes. Os efeitos da luz solar sobre o Homem, microrganismos e produtos químicos, tornaram-se uma questão de grande interesse e experimentação no século XIX (Kowalski, 2009). A descoberta da radiação ultravioleta está diretamente relacionada com a observação do escurecimento dos sais de prata quando expostos à luz Solar. Em 1801, o físico alemão Johann Wilhelm Ritter registou que os raios invisíveis imediatamente acima do limite superior do espectro visível eram particularmente eficazes a escurecer papel ensopado em cloreto de prata. Chamou-lhes raios desoxidantes para dar ênfase à sua reatividade química e distingui-los dos raios de calor (ou infravermelhos) na outra ponta do espectro visível. O termo raio químico foi usado para os designar ao longo de todo o século XIX, embora tenha acabado por ser substituído pela atual terminologia, raios ultravioleta (Bolton & Cotton, 2008).

As propriedades básicas dos raios ultravioleta são as mesmas da luz: propagação em linha reta com uma velocidade de 300 000 quilómetros por segundo no vácuo e a capacidade de atravessar certos objetos como, por exemplo, o quartzo (Braga, 2017).

Normalmente, o comprimento de onda para processamento da radiação UV varia entre 100 e 400 nm. Este intervalo pode ser subdividido em UV-A (315-400 nm), normalmente responsável por alterações na pele humana, denominado bronzeamento; UV-B (280-315 nm), que pode causar queimaduras e eventualmente levar a cancro de pele; UV-C (200-280 nm), denominado faixa germicida, uma vez que efetivamente inativa bactérias e vírus; e UV-V de vácuo (100-200 nm) (tabela 6). O UV-C curto é quase completamente absorvido no ar dentro de algumas centenas de metros, e quase nunca é observado na natureza, devido à sua rápida absorção (Koutchma, 2009; Choudhary & Bandla, 2012).

Tabela 6. Características da luz ultravioleta (Adaptado de Guerrero-Beltran & Barbosa-Cánovas, 2004).

Tipo de radiação UV	Comprimento de onda	Características
UV – A	320 – 400 nm	Alterações de pele (bronzeado)
UV – B	280 – 320 nm	Queimaduras de pele (cancro)
UV – C	200 – 280 nm	Capacidade germicida
UV - V	100 – 200 nm	UV de vácuo

7.2. Geração e propagação da radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta é gerada através de uma diferença de potencial que provoca o estado de excitação dos átomos. O átomo é a unidade fundamental da matéria sendo a menor fração capaz de identificar um elemento químico. É formado por um núcleo, que contém neutrões sem carga elétrica e prótons com carga elétrica positiva, e por eletrões com carga elétrica negativa que circundam o núcleo em diferentes órbitas (Atkins & Jones, 2012). Este estado de excitação dos átomos pode ocorrer devido ao efeito do calor, da radiação gama, dos raios X e dos raios cósmicos, e tem como consequência a absorção da energia por parte dos eletrões. Os eletrões ocupam, em cada órbita, um estado de energia único. Nas órbitas mais próximas do núcleo os eletrões possuem uma energia menor, ao contrário dos que se encontram nas órbitas mais afastadas. Quando ocorre a transição de eletrões de uma órbita com energia superior para uma de energia inferior, uma quantidade discreta de energia é libertada como fotões de luz. Os níveis de energia de um determinado átomo são únicos, decorrentes do número de eletrões, prótons e neutrões. Como tal, cada elemento emite um espectro único de luz. Se a diferença entre os níveis de energia for apropriada, a radiação emitida é UV (Koutchma, 2009). Além do sol, existem diversas fontes de raios ultravioleta, algumas das quais ao nosso alcance. Na prática, a radiação UV é gerada pela aplicação de uma diferença de potencial numa lâmpada que gera uma descarga elétrica dentro de um tubo de quartzo contendo uma mistura de gás, o que provoca o estado de excitação dos átomos. Estes, ao voltarem ao estado original de energia, emitem radiação num comprimento de onda de 100 a 400 nm (Environmental Protection Agency [EPA], 2006).

7.3. Funcionamento da radiação ultravioleta

A radiação ultravioleta pode ser aplicada de dois modos: contínuo ou pulsátil. O modo contínuo é o convencional, que faz incidir a radiação ultravioleta de forma ininterrupta, com comprimentos de onda entre os 100 e os 400nm, e o modo pulsátil, que gera pulsos intensos de curta duração e de largo espectro, variando entre 100 a 1100 nm (Gómez-López, Ragaert, Debevere, Devlieghere, 2007; Krishnamurthy, Demirci, Irudayaraj, 2007; Oms-Oliu, Martín-Belloso, Soliva-Fortuny, 2010). Este último, devido às suas características, é atualmente utilizado na inativação de microrganismos sendo realmente eficaz nesta ação (Gómez-López et al., 2007). O sistema de produção de radiação UV pulsátil é constituído por três componentes principais: a fonte de alimentação, o dispositivo de configuração de pulso e a lâmpada. Inicialmente, a energia é armazenada num capacitador de alta potência durante cerca de uma fração de segundo, a partir do qual é libertada para uma lâmpada num curto

período de tempo, nanossegundos a milissegundos, sendo de seguida projetada num intervalo de tempo muito inferior, em microssegundos (Elmnasser et al., 2007). A radiação ultravioleta de modo pulsátil (LP) é uma técnica que recebeu vários nomes na literatura científica tais como “Luz UV pulsátil” (Sharma & Demirci, 2003), “Luz pulsátil de largo espectro e de alta intensidade” (Roberts & Hope, 2003), “Luz pulsátil” (Rowan et al., 1999) e “Luz branca pulsátil” (Marquenie, et al., 2003; Gómez-López et al., 2007;), e é hoje, segundo Krishnamurthy et al., 2007, considerada uma tecnologia emergente e com potencial para ser usado como tecnologia de pasteurização em situações de processamento específicos, como operações de processamento de leite em pequena escala.

7.4. Equipamento UV para o tratamento de fluidos

O equipamento UV para o tratamento de líquidos pode ser simples, apenas um reator com uma ou várias lâmpadas, ou composto, quando possui vários reatores em série (Guedes, Novello, Mendes & Cristianini, 2009). De acordo com Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas (2004), o equipamento mais simples para a desinfecção com radiação UV é constituído por um sistema tubular, que inclui uma lâmpada envolvida por um tubo de quartzo sobre o qual circula um pequeno filme de líquido a ser tratado, uma ou várias vezes, até alcançar o efeito germicida desejado. De entre todos os constituintes do sistema, as lâmpadas e os reatores têm um papel relevante.

A eficiência da lâmpada é, geralmente, definida como a proporção entre a saída de energia UV total na região germicida e a entrada de energia elétrica externa. A grande maioria das lâmpadas usadas nos sistemas de desinfecção UV são lâmpadas de vapor de mercúrio. Nessas lâmpadas, a corrente elétrica que flui através do plasma quente ionizado faz com que os átomos de mercúrio alterem o seu estado de energia, passando para estados mais altos ou estados excitados. Quando os átomos retornam ao seu estado fundamental, a radiação UV é emitida com um comprimento de onda inversamente proporcional à diferença de energia entre o estado excitado e o estado fundamental. São normalmente utilizados dois tipos de lâmpadas UV: as de baixa pressão ou monocromáticas, onde podemos encontrar as lâmpadas de baixa pressão e as lâmpadas de amálgama; e as de pressão média ou policromáticas. Estes termos baseiam-se na pressão de vapor de mercúrio quando as luzes estão a funcionar (Bolton & Cotton, 2008; Koutchma, 2009).

As lâmpadas de baixa pressão emitem essencialmente radiação monocromática a um comprimento de onda de cerca de 254nm. Este tipo de lâmpada é o mais comum, possuem um tubo de quartzo e dois filamentos de tungsténio e contêm 60mg de mercúrio a 10Torr, aproximadamente. As lâmpadas de amálgamas são também monocromáticas e contêm mais

de 120mg de mercúrio, no entanto, necessitam de mais tempo para alcançar o rendimento máximo. As lâmpadas de pressão média têm uma saída espectral que vai desde os 200 nm até comprimentos de onda de quase 600nm, o que resulta numa série de emissões na região UV e no intervalo do visível. Estas contêm cerca de 300mg de mercúrio a 1000Torr. Contudo, operam a elevadas temperaturas, a superfície da lâmpada pode alcançar os 800°C, implicando por isso um elevado consumo de energia (Koutchma, 2009; Kowalsky, 2009).

Um fator importante a considerar na escolha do tipo de lâmpada é a sua eficiência germicida. As lâmpadas de baixa pressão apresentam o dobro da eficiência das lâmpadas de pressão média (Bolton & Cotton, 2008). Oliveira & Anjos (2012) reforçaram esta ideia através do seu estudo, onde verificaram uma redução microbiana significativa no tratamento UV de leite com o uso das lâmpadas de baixa pressão. No entanto, o custo geral do ciclo de vida deve ser considerado, incluindo manutenção, porque o benefício de uma maior eficiência pode ser compensado por menores custos de capital e manutenção (Bolton & Cotton, 2008).

Relativamente aos reatores, Koutchma (2009) descreveram dois tipos principais de reatores para lâmpadas UV atualmente utilizados no tratamento de fluidos alimentares: os de fluxo laminar e os de fluxo turbulento. Os de fluxo laminar são usados em líquidos com baixa viscosidade e expostos em camadas finas, de maneira a assegurar uma suficiente exposição à radiação UV (Forney & Pierson, 2003). Nos reatores de fluxo turbulento, tal como o nome indica, há um aumento da turbulência dentro do reator com o objetivo de expor a totalidade do líquido à radiação UV, promovendo assim a homogeneização durante o tratamento (Koutchma, Keller, Chirtel & Parisi, 2004; Koutchma, 2009).

Nos sistemas de tratamento de fluidos pode ocorrer o fenómeno de *fouling*, que consiste num declínio progressivo na eficiência de inativação com o tempo, devido ao acúmulo de depósitos sobre a superfície de transferência. Este fenómeno é considerado um importante fator limitante na eficiência dos reatores dos equipamentos de tratamento UV convencionais. O material absorve a radiação UV e/ou impede a sua penetração no fluido a ser tratado reduzindo bastante a capacidade de descontaminação da unidade. Um fluxo com movimentos em dupla espiral através de tubos helicoidais pode ser uma opção para reduzir esta ocorrência (Guedes et al., 2009). A *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda o uso do fluxo turbulento, visto que este favorece a homogeneização do fluido a ser tratado.

7.5. Inativação dos microrganismos pela radiação ultravioleta

O efeito da radiação ultravioleta nos microrganismos tem vindo a ser estudado ao longo dos anos. Downes e Blunt em 1877 demonstraram a ação letal da luz solar em certas bactérias. Em 1887, Roux veio reforçar essa ideia, mostrando que os esporos e as bactérias podiam ser destruídos pelas radiações solares. Barnard e Morgan, em 1903, para além de confirmarem as teorias anteriormente estudadas, relataram que a ação bactericida da radiação era limitada, funcionando apenas dentro de um determinado intervalo de comprimento de onda (Rentschler, Nagy, Mouromseff, 1940). Mais tarde, em 1998, Bolton et al. descobriram que a radiação ultravioleta era muito eficaz contra *Cryptosporidium* e mais tarde *Giardia*, o que indicou que a desinfecção UV poderia ser utilizada como desinfetante de amplo espectro capaz de inativar quase todos os vírus, bactérias e protozoários. Isto provocou, a partir de 1999, um aumento notável no interesse pela desinfecção UV no tratamento de água potável. Em 2001, Sommer e outros autores indicaram que o número de instalações UV na Europa aumentou em grande escala. Posto isto, em 2003, a *Environmental Protection Agency* (EPA) emitiu o primeiro rascunho de tratamento de água que inclui a desinfecção UV como técnica de tratamento, emitindo também um manual de guia de desinfecção ultravioleta. Isto estimulou a instalação de grandes sistemas de desinfecção UV em toda a América do Norte (Bolton & Cotton, 2008).

Antes de se aprofundar este tema, deve, em primeiro lugar, fazer-se a distinção entre a inativação e a morte de microrganismos. Para desinfetantes químicos como o cloro e o dióxido de cloro, inativar e matar podem ser considerados sinónimos, uma vez que estes destroem e danificam estruturas celulares dos microrganismos, o que interfere no seu metabolismo, na sua biossíntese e no seu crescimento. Ao contrário da radiação UV, que não destrói nem danifica as suas estruturas celulares, apenas impede a sua reprodução. Os microrganismos que não se podem reproduzir não podem infetar, logo tornam-se inativos (Koutchma, 2009).

Embora todos os comprimentos de onda UV causem alguns efeitos fotoquímicos, os comprimentos de onda na faixa UVC (200-280nm), conhecida como faixa germicida, são particularmente prejudiciais às células, afetando bactérias, vírus e outros agentes patogénicos. O maior efeito germicida é obtido com radiação entre 250 e 270nm, mas pode diminuir à medida que o comprimento de onda aumenta (Guerrero-Beltrán & Barbosa-Cánovas, 2004; Kowalsky, 2009; Kneissl & Rass, 2016). Os ácidos nucleicos, ácido desoxirribonucleico (ADN) e ácido ribonucleico (ARN), representam os constituintes celulares alvo para a inativação pela radiação UV na maioria dos microrganismos (Bolton, 2000).

Segundo Elmnasser et al. (2007), existem dois mecanismos de ação da radiação UV sobre os microrganismos: o mecanismo fotoquímico e o fototérmico. O efeito germicida da radiação UV depende principalmente das transformações químicas consequentes da absorção da radiação pelas proteínas e pelos ácidos nucleicos (ARN e ADN) de um dado microrganismo. O ADN é um ácido nucleico que contém uma sequência de quatro bases nitrogenadas, a adenina, a citosina, a guanina e a timina, uma sequência que constitui o código genético. As duas hélices que compõem o ADN permanecem ligadas pelas ligações de hidrogénio que são estabelecidas entre as bases emparelhadas de ambas as hélices, adenina com timina e citosina com guanina. Algumas moléculas presentes no ADN, como as purinas e as pirimidinas, absorvem grande parte da radiação e sofrem alterações químicas, formando dímeros e hidratos.

A dimerização da timina foi considerada a principal causa do efeito mutagénico da radiação UV. Se uma das duas timinas adjacentes absorver um fotão UV, forma-se o dímero e a estrutura do ADN é quebrada, bloqueando assim a sua replicação e consequentemente a capacidade reprodutiva do microrganismo. Este é o mecanismo fundamental de desinfecção UV, mostrado na figura 18 (Bolton, 2000).

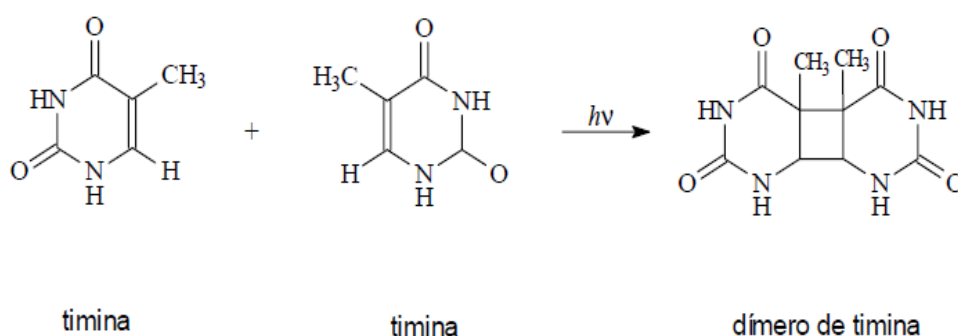


Figura 18. Dimerização fotoquímica de duas bases de timina (Adaptado de Bolton, 2000).

Em alguns casos, estas transformações podem ser reversíveis através do fenómeno conhecido como fotorreativação, onde enzimas ativadas pela radiação UV quebram as ligações covalentes dos dímeros de pirimidina (Matak, 2004).

Relativamente ao mecanismo fototérmico, este ocorre através de um superaquecimento devido às diferenças de absorção da radiação UV pela bactéria e pelo meio. Neste caso, a água existente na bactéria é vaporizada, levando a um pequeno fluxo de vapor que causa a rutura da membrana da célula microbiana (Elmnasser et al., 2007).

Contudo, a inativação dos microrganismos pela radiação ultravioleta pode ser afetada por diversos fatores, como por exemplo o tipo e o número de microrganismos presentes, a

dose de radiação UV, bem como as características do meio a ser desinfetado (Gelsinger, Gray, Jones, Heinrichs, 2014). Avanços recentes na ciência e na engenharia da radiação UV demonstraram que esta é uma promessa considerável no processamento de alimentos como alternativa ao tratamento térmico tradicional para alimentos líquidos (Koutchma, 2009).

7.6. Ação da radiação ultravioleta no leite

Hoje em dia, o consumidor em geral demonstra uma maior preocupação relativamente à qualidade e segurança dos produtos alimentares, procurando, cada vez mais, alimentos saborosos mas ao mesmo tempo seguros, saudáveis, orgânicos, naturais e frescos. Esta crescente preferência por produtos alimentares de alta qualidade e nutrição levou à procura e ao desenvolvimento, por parte da indústria alimentar, de novas técnicas de processamento. O uso da radiação UV na preservação física dos alimentos passou a ser uma opção viável como método de processamento não térmico. A aplicação da radiação UV para processar produtos alimentares é uma área relativamente nova e desafiante em comparação com o tratamento UV de águas, desinfecção do ar e descontaminação de superfícies (Koutchma, 2009; Guneser & Yuceer, 2012). Ainda assim, têm sido realizados alguns estudos sobre a ação UV no leite.

A pasteurização é o tratamento mais utilizado para a inativação microbiana no leite e noutros produtos lácteos. No entanto, o processo é conhecido por ter efeitos adversos sobre o produto final, pois causa desnaturação térmica de proteínas, uma diminuição do valor nutricional, um aumento nos compostos aromáticos gerados pelo calor e a deterioração dos atributos sensoriais. Como consequência, as tecnologias não térmicas emergentes foram avaliadas como possíveis alternativas (Engin & Yuceer, 2012; Alberini, Simmons, Parker, Koutchma, 2015).

A radiação ultravioleta tem uma capacidade de penetração nos alimentos relativamente curta e depende diretamente das propriedades óticas dos alimentos. Guerrero-Beltrán e Barbosa-Cánovas (2004) declararam que a cor ou a turvação do líquido influencia o coeficiente de absorção ótica do líquido. A capacidade de penetração da radiação UV diminui à medida que o coeficiente de absorção aumenta. Portanto, é essencial compreender que o aumento da profundidade da penetração será benéfico para o tratamento com radiação UV de alimentos com maiores coeficientes de absorção. A apresentação de alimentos em camadas finas pode resultar num aumento na eficiência da inativação de microrganismos (Choudhary & Bandla, 2012).

Na prática, a aplicação do tratamento UV no leite tem sido desafiante por duas principais razões: o teor de sólidos do leite limita a penetração da radiação UV, reduzindo

assim a sua eficácia; e a exposição excessiva aos raios UV pode levar a defeitos sensoriais no leite (Reinemann, Gouws, Cilliers, Houck & Bishop, 2006). Segundo Matak (2004), a radiação UV pode ser utilizada para a redução de *Listeria monocytogenes* no leite de cabra, pois constataram no seu estudo uma redução de 1×10^5 (5 reduções logarítmicas) quando o leite foi exposto a uma dose UV de $15,8 \pm 1,6 \text{ mJ/cm}^2$. Pereira et al. (2014) relataram uma redução significativa da maioria das espécies bacterianas inoculadas no leite, entre elas, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* e *Acinetobacter Baumannii*. Kasahara, Carrasco & Aguilar, (2015), também demonstraram que foi possível obter 6 reduções logarítmicas da população de *Escherichia coli* em leite de cabra através do tratamento UV com uma dose de 10.000 mJ/cm^2 . Através dos seus estudos, Lu, Li & Liu (2011) comprovaram aproximadamente 3 a 4 reduções logarítmicas das bactérias aeróbicas totais presentes no leite tratado com radiação UV.

Em contrapartida, alguns estudos relataram que a radiação UV pode provocar algumas alterações no leite como a desnaturação de componentes tais como proteínas e enzimas provocando também mudanças da textura e do aroma (Matak 2004; Choudhary & Bandla, 2012; Kasahara et al., 2015). Além disto, Pereira et al. (2014) concluiu que o tratamento do colostro com radiação UV reduz a concentração de lactoglobulina G. Kolakowska & Bartosz (2003) relataram que há mudanças óbvias na composição química de componentes alimentares e deterioração da qualidade do produto quando o tratamento com radiação UV é aplicado em altas doses. É, portanto, obrigatório otimizar adequadamente o processo de desinfecção para que a qualidade e a segurança dos produtos alimentares sejam mantidas. Normalmente, a inativação microbiana pode ser alcançada num curto intervalo de tempo (segundos a minutos), dependendo da opacidade dos produtos alimentares e do tipo de microrganismo (Choudhary & Bandla, 2012).

IV. ANÁLISE PRÁTICA

1. Objetivos

Nesta dissertação de mestrado procurou-se avaliar o efeito da radiação ultravioleta no teor de microrganismos aeróbios totais no leite de burra da raça Asinina de Miranda, sendo o objetivo final oferecer viabilidade a esta tecnologia emergente junto das empresas do sector.

2. Materiais e métodos

2.1. População em estudo e amostragem

Este estudo foi realizado entre abril de 2015 e janeiro de 2016 na Naturasin Lda., uma empresa portuguesa que se dedica à criação de gado da raça Asinina de Miranda (figura 19) e à produção de leite de burra em pó, que tem como principal destino a indústria da cosmética. A Naturasin está sediada no Couço, Coruche, mais especificamente no Monte das Faias possuindo uma área total de 492 hectares e um efetivo de 47 animais.

O número de animais em produção varia entre 8 a 14, as ordenhas (figura 20) ocorrem durante todo o ano, e cada burra produz em média 1,6L por dia. O leite é posteriormente congelado e dividido em diferentes lotes de 2L devidamente identificados (figura 21). Assim que se atinge um volume de leite viável a ser tratado, procede-se ao seu descongelamento e pasteurização em método de tanque (LTLT). Após pasteurizado, o leite é finalmente sujeito ao processo de liofilização.

Neste trabalho foi testada a possibilidade do uso da radiação UV na fase de pasteurização. Para tal, foram realizados 17 ensaios, 2 ensaios (A e B) para testes preliminares e 15 ensaios para análise estatística, com amostras de leite descongelado (figura 22), num protótipo - bomba inox TRIN200 dosagem temporizada em monobloco com rodas desenvolvido para o efeito pelas empresas Naturasin e Multifiltra Lda.



Figura 19. Fêmeas da raça Asinina de Miranda (Imagem cedida pela Naturasin).



Figura 20. Sala de ordenha (Imagem cedida pela Naturasin).



Figura 21. Lotes de leite congelado (Imagem cedida pela Naturasin).



Figura 22. Protótipo - Bomba inox TRIN200 dosagem temporizada em monobloco com rodas (Fonte: o autor).

2.2. Caracterização e funcionamento do protótipo

O protótipo utilizado para o tratamento do leite com radiação ultravioleta é um equipamento devidamente qualificado para o tratamento de líquidos alimentares. Trata-se de uma estrutura em aço inoxidável AISI 304L EN 1.4307, composta por uma única lâmpada UV 412 de baixa pressão com consumo total 44W, potência de 40W e eficiência 99%, uma bomba TRINOX 0,35 HP com 1400 rotações por minuto com capacidade de tratar volumes até 700L/min e de elevar líquido até 30 metros, com uma temperatura máxima de 90°C e uma pressão máxima de 5 bar.

A circulação do líquido no equipamento tem início num recipiente de aço inoxidável, ao ser bombeado passa pela lâmpada UV recebendo a dose ultravioleta e volta ao recipiente inicial. O ponto de recolha da amostra é uma pequena torneira que se encontra imediatamente após a lâmpada UV, possibilitando assim obter as amostras com as doses pretendidas (figura 23).

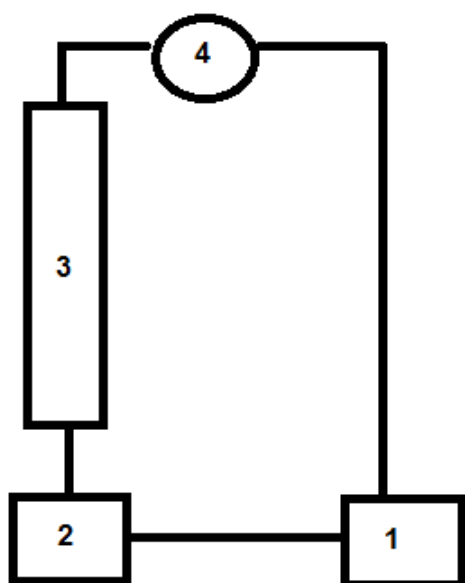


Figura 23. Esquema representativo da circulação do leite no protótipo. O leite sai do recipiente (1) através da ação da bomba (2), segue passando pela lâmpada UV (3), passa pelo ponto de recolha (4) e regressa ao recipiente (1) (Fonte: autor).

De maneira a garantir uma viável e correta utilização do protótipo durante o estudo foram realizados alguns testes preliminares. Sabia-se que a bomba Trinox tinha a capacidade de bombear 700L/min, no entanto, para o estudo só era necessário tratar 5L, e por isso foi preciso limitar a sua capacidade a 14L/min. Já com a bomba funcional realizaram-se dois ensaios com doses bastante acima das utilizadas neste trabalho, com o objetivo de se

constatar possíveis dificuldades no funcionamento do protótipo e analisar o comportamento do leite perante a exposição a diferentes doses de radiação ultravioleta.

2.3. Cálculos efetuados para obtenção das amostras

Para obtenção das amostras com as doses de radiação ultravioleta pretendidas foi realizado um protocolo com base na quantidade de energia UV que deve ser fornecida por volume de leite a ser tratado, através da equação usada por Reinemann et al. (2006) nas operações em lote onde o líquido é re-circulado:

$$DUV = (PUV \times t) / V$$

DUV = dose UV (J/L)

PUV = potência da lâmpada x eficiência (W)

t = tempo de tratamento (s)

V = volume a ser tratado (L)

Segundo a *European Food Safety Authority* (EFSA) (2016), a dose de radiação ultravioleta que deve ser aplicada é de 1045J/L e por isso, em conjunto com a Naturasin, optámos por testar doses UV abaixo e acima desta. Assim foi calculado o tempo necessário de exposição do leite à radiação UV para obter doses de 500J/L, 1000J/L, 1500J/L e 2000J/L. A recolha das amostras foi feita com a ajuda de um cronómetro e em copos estéreis de 100mL através do ponto de recolha (figura 24).



Figura 24. Copos das amostras identificados, cronómetro utilizado durante as recolhas e controlo do pH da água através das tiras de pH (Fonte: autor).

Tendo um volume inicial de 5L de leite a tratar, amostras de 0,09L e uma lâmpada UV de baixa pressão, inserida num tubo de inox (figura 25), com potência de 40W e eficiência de 99% foram efetuados os seguintes cálculos:

Para uma dose UV = 500 J/L e com volume 5L:

$$500 = ((40 \times 0,99) \times t) / 5$$

$$500 = (39,6 \times t) / 5$$

$$t = 63,13 \text{ s} \approx 63 \text{ s} = 1,05 \text{ minutos} = 1'03''$$

Foi-se subtraindo o volume que se retirou para cada copo, de maneira a calcular corretamente a dose que o leite recebe.

Para uma dose UV = 1000 J / L e com volume 4,91L:

$$1000 = ((40 \times 0,99) \times t) / 4,91$$

$$1000 = (39,6 \times t) / 4,91$$

$$t = 123,98 \approx 124 \text{ s} = 2,07 \text{ minutos} = 2'04''$$

Para uma dose UV = 1500 J / L e com volume 4,82L:

$$1500 = ((40 \times 0,99) \times t) / 4,82$$

$$1500 = (39,6 \times t) / 4,82$$

$$t = 182,58 \text{ s} \approx 183 \text{ s} = 3,05 \text{ minutos} = 3'03''$$

Para uma dose UV = 2000 J / L e com volume 4,73L:

$$2000 = ((40 \times 0,99) \times t) / 4,73$$

$$2000 = (39,6 \times t) / 4,73$$

$$t = 238,89 \approx 239 \text{ s} = 3,98 \text{ minutos} = 3'59''$$

Através destes cálculos concluímos que a recolha das amostras teria que ser aos 1'03'', 2'04'', 3'03'' e 3'59'' para obter leite com doses de 500J/L, 1000J/L, 1500J/L e 2000J/L, respetivamente (tabela 7).

Tabela 7. Tempo de exposição e dose UV.

DOSE UV (J/L)	TEMPO DE EXPOSIÇÃO (s)
500	63
1000	124
1500	183
2000	239

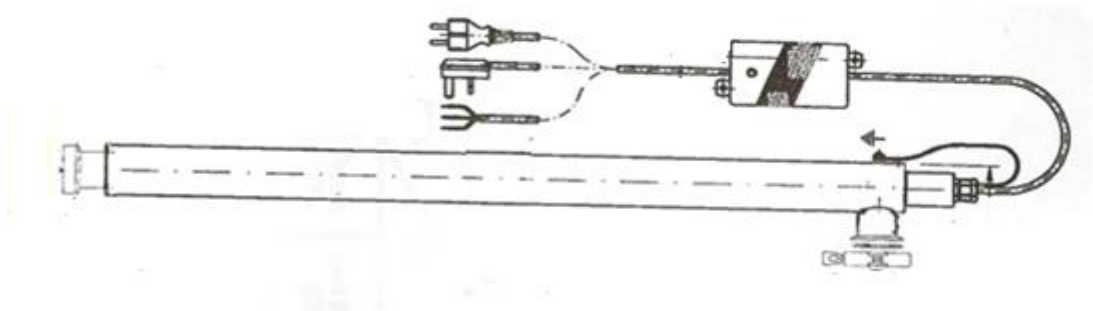


Figura 25. Esquema representativo do tubo de inox que inclui a lâmpada UV (Fonte: imagem cedida pela empresa Multifiltra, Lda.).

2.4. Procedimento realizado na exploração

O processo de recolha das amostras foi dividido em 3 etapas. A primeira consistiu na desinfecção do protótipo, começando com um pré-enxaguamento adequado, com água tratada por um sistema de ultravioleta e de pH neutro, colocando em circulação a solução alcalina P3-ultrasil-11 numa concentração 0,7% a 50°C durante 40 minutos, e fazendo novo enxaguamento profundo durante 30 minutos para retirar a solução alcalina. De seguida colocou-se em circulação o desinfetante P3-oxonia ativo com concentração 0,2% a 18°C durante 30 minutos e efetuou-se outro enxaguamento durante 40 minutos para remoção do desinfetante.

Na segunda etapa procedeu-se à identificação dos seis copos esterilizados de 100mL, onde:

- TMT 1 corresponde a leite sem tratamento,
- TMT 2 a leite pasteurizado usando o método de tanque (LTLT) a 65°C durante 30 minutos,
- TMT 3 a leite tratado por UV com 500J/L,
- TMT 4 a leite tratado por UV com 1000J/L,
- TMT 5 a leite tratado por UV com 1500J/L,
- TMT 6 a leite tratado por UV com 2000J/L.

Dos 6L de leite previamente descongelado a uma temperatura de 4°C, colocaram-se 5L num recipiente para tratamento com radiação ultravioleta. A partir do restante retirou-se com uma seringa esterilizada, 0,09L de leite para o copo identificado com TMT 1 para obtenção do valor microbiano inicial e o mesmo volume de leite para o copo identificado com TMT 2 para posterior pasteurização. Estas amostras foram armazenadas a 4°C.

Após as duas primeiras recolhas, deu-se início ao tratamento dos 5L de leite com radiação ultravioleta. Com o protótipo devidamente ligado, recolheram-se 0,09L de leite através do ponto de recolha, em intervalos de tempo controlados:

- 1 minuto e 3 segundos,
- 2 minutos e 4 segundos,
- 3 minutos e 3 segundos,
- 3 minutos e 59 segundos.

As amostras foram devidamente recolhidas nos copos identificados com TMT 3, TMT 4, TMT 5 e TMT 6, respetivamente, todas armazenadas a 4°C.

A terceira etapa consistiu numa nova desinfecção do protótipo, repetindo-se o processo descrito na primeira etapa.

2.5. Análises microbiológicas efetuadas no leite

Todas as amostras, após a sua recolha, foram submetidas a análises microbiológicas para contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C. As análises microbiológicas que verificam a quantidade de microrganismos presentes são fundamentais para se conhecerem as condições de higiene em que o alimento foi processado (Franco & Landgraf, 2003). O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios mesófilos, aeróbios psicotróficos, termófilos, bolores e leveduras, variando o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (Silva, Junqueira & Silveira, 1997; Hajdenwurcel, 1998). Para a contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C foi utilizada a Norma Portuguesa (NP) 4405 de 2002. A preparação das amostras para a análise microbiológica foi feita com base na ISO 6887-2 de 1999 que dita que as amostras devem ser manipuladas de modo a evitar qualquer contaminação por parte dos operadores ou do meio ambiente que as rodeia. Assim deve-se garantir que todos os utensílios de trabalho estejam esterilizados e que o ambiente seja o mais estéril possível trabalhando junto a um bico de *Busen* ou numa câmara de fluxo laminar.

No laboratório começámos pela identificação das placas de petri e dos tubos de ensaio (figura 26), identificando o ensaio através de letras e indicando as amostras e diluições correspondentes com recurso a números, por exemplo A1-1, significa que estamos perante a primeira diluição (10^{-1}) da amostra 1 do ensaio A.

Após a identificação iniciou-se o processo para obter a suspensão-mãe. Nas amostras de alimentos líquidos, de maneira a obter a suspensão-mãe ou primeira diluição, é necessário, após a homogeneização, adicionar a um volume de 9mL de soluto diluidor 1mL da amostra.

Por isso foram colocados 9mL de Triptona sal de pH 7 nos tubos de ensaio. Neste estudo, foram realizadas para cada amostra 3 diluições decimais seriadas, com recurso a 3 placas de petri e 3 tubos de ensaio correspondentes (NP 4405, 2002).



Figura 26. Tubos de ensaio, placas de petri, bico de *busen*, pipeta e copo com amostra de leite de cru (Fonte: autor).

Seguiu-se a realização das diluições decimais seriadas e para a sementeira por incorporação de 1mL de inóculo das diluições escolhidas em placa de petri:

- Com uma pipeta retirou-se 1mL da amostra para o tubo identificado com diluição 10^{-1} e homogeneizou-se no vórtex.
- Após a homogeneização, com uma nova ponta na pipeta, retirou-se 1mL do tubo (10^{-1}) para a placa correspondente, ou seja, identificada com 10^{-1} .
- Ainda com a pipeta retirou-se 1mL do tubo 10^{-1} e colocou-se no tubo 10^{-2} . Homogeneizou-se no vórtex e com uma nova ponta na pipeta retirou-se 1mL deste tubo e colocou-se na placa 10^{-2} .
- Utilizando novamente a pipeta, retirou-se 1mL do tubo 10^{-2} , para o tubo 10^{-3} e homogeneizou-se a solução no vórtex.
- Com uma nova ponta na pipeta, retirou-se 1mL deste tubo e colocou-se na placa correspondente 10^{-3} .
- De seguida adicionaram-se às placas de petri 15mL do meio Triptona Glucose Agar (TGA) previamente fundido e mantido a 47°C , e homogeneizou-se o inóculo no meio de cultura realizando movimentos circulares.
- Após a homogeneização, deixou-se o meio solidificar durante 15 minutos e colocaram-se as placas semeadas em estufa a 30°C durante 48h.
- De seguida, procedeu-se à contagem de todas as colónias presentes em cada uma de duas placas semeadas de duas diluições sucessivas apresentando pelo menos 10

colónias e expressando em ufc/g (ufc – unidades formadoras de colónias) de amostra de acordo com a fórmula:

$$\frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

ΣC – soma das colónias contadas em duas placas de duas diluições sucessivas e que contenham pelo menos 10 colónias

V – volume semeado em cada uma das placas

d – diluição correspondente à primeira diluição considerada

3. Métodos estatísticos

A análise estatística dos 15 ensaios foi realizada no programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 22. Foram realizadas estatísticas descritivas para as variáveis: teor de microrganismos aeróbios totais (TMT) e melhoria cumulativa em percentagem (%), que corresponde à redução do TMT. A variável TMT 1, como descrito anteriormente, corresponde ao valor da carga microbiana inicial do leite sem tratamento. O TMT 2 corresponde ao valor da carga microbiana após pasteurização LTLT não sendo incluída nesta análise estatística. Já os valores TMT 3, TMT 4, TMT 5 e TMT 6 representam o valor microbiano do leite tratado com radiação UV nas doses 500J/L, 1000J/L, 1500J/L e 2000J/L, respetivamente. A análise estatística inferencial baseou-se em testes de análise de variância one-way ANOVA.

4. Resultados

4.1. Resultados dos testes preliminares

Os resultados dos testes preliminares estão representados nas tabelas 8 e 9 com a denominação de ensaio A e B, respectivamente. É importante ressaltar que estes resultados não sofreram qualquer análise estatística, tal como o nome indica, foram testes realizados com o objectivo de otimizar todos os procedimentos e consequentemente os resultados dos 15 ensaios analisados estatisticamente neste estudo.

Tabela 8. Descrição dos resultados do ensaio A.

Amostra	Tratamento do leite	TMT (ufc/mL)
T1A	Sem tratamento	12 000
T2A	Pasteurização LTLT	<100
T3A	Dose UV 1500 J/L	32 0000 0000
T4A	Dose UV 2500 J/L	1 100
T5A	Dose UV 4000 J/L	<100
T6A	Dose UV 5500 J/L	200

Tabela 9. Descrição dos resultados do ensaio B.

Amostra	Tratamento do leite	TMT (ufc/mL)
T1B	Sem tratamento	74 0000
T2B	Pasteurização LTLT	200
T3B	Dose UV 1 000 J/L	3 200
T4B	Dose UV 2 000 J/L	1 400
T5B	Dose UV 2 500 J/L	900
T6B	Dose UV 3 500 J/L	800
T7B	Dose UV 4 500 J/L	100

Durante a recolha das amostras do ensaio A pôde verificar-se o aparecimento do cheiro a cozido e da cor amarela a partir da amostra T4A, características que se foram intensificando até ao final do tratamento. Após a análise destes resultados, e tendo em conta apenas as amostras de leite tratado com radiação UV, verificou-se uma redução acentuada do TMT entre os momentos T1A e T4A e T4A e T5A. Já entre os momentos T1A e T3A e T5A e T6A, verificou-se um aumento no TMT, consequência de uma possível contaminação das amostras. Observou-se que o leite apresentou a reação de *Maillard* quando tratado com doses iguais ou superiores a 2500J/L.

No ensaio B tentou-se diminuir a probabilidade de contaminação aplicando mais medidas de higiene. Durante a recolha destas amostras, pôde verificar-se o aparecimento do cheiro a cozido e da cor amarela a partir da amostra T5B, características que se foram intensificando até ao final do tratamento. Após a análise destes resultados, e tendo em conta apenas as amostras de leite tratado com radiação UV, verificou-se uma redução acentuada de TMT ao longo de todo o tratamento. Constatou-se, tal como no ensaio A, que o leite apresenta a reação de *Maillard* quando tratado com doses iguais ou superiores a 2500 J/L. É importante referir que neste ensaio a radiação UV permitiu obter leite com valores de TMT inferiores aos da pasteurização (LTLT), no entanto, as características organoléticas do leite

tratado com a radiação UV, ao contrário das do leite pasteurizado, apresentaram-se bastante alteradas.

4.2. Resultados do estudo efetuado

As tabelas 10 e 11 apresentam as estatísticas descritivas das variáveis TMT e melhoria cumulativa (%) resultantes da análise das amostras de leite provenientes dos 15 ensaios realizados neste estudo. Na tabela 10 observa-se uma redução do valor médio de TMT de $1,21 \times 10^4$ ufc/mL em TMT 1 para $1,87 \times 10^3$ ufc/mL TMT 6. Na tabela 11 verifica-se um aumento gradual do valor médio da melhoria cumulativa, passando de uma redução de $56,14 \pm 20,71\%$ na melhoria 1 para uma redução de $85,97 \pm 10,47\%$ na melhoria 4.

Tabela 10. Estatística descritiva da variável TMT (teor MO aeróbios totais).

MO aeróbios (ufc/mL)		TMT 1 Sem tratamento UV	TMT 3 UV 500 J/L	TMT 4 UV 1000 J/L	TMT 5 UV 1500 J/L	TMT 6 UV 2000 J/L
Média		12140,000	5926,429	2831,333	2348,667	1868,667
I.C.95%	Mínimo	4844,548	2136,850	1319,790	531,061	344,558
	Máximo	19435,452	9716,008	4342,877	4166,272	3392,775
Mediana		6400,000	4150,000	2100,000	680,000	520,000
Desvio Padrão		13173,8811	6563,3734	2729,4946	3282,1702	2752,1832
Mínimo		1900,0	160,0	510,0	250,0	160,0
Máximo		47000,0	22000,0	9500,0	12000,0	9000,0

Tabela 11. Estatística descritiva da variável de melhoria cumulativa (%).

MO aeróbios (%)		Melhoria 1 (TMT1 a TMT3) UV 500 J/L	Melhoria 2 (TMT3 a TMT4) UV 1000 J/L	Melhoria 3 (TMT4 a TMT5) UV 1500 J/L	Melhoria 4 (TMT 5 a TMT6) UV 2000 J/L
Média		56,14%	69,70%	82,28%	85,97%
I.C.95%	Mínimo	44,17%	58,48%	75,81%	80,17%
	Máximo	68,1%	80,92%	88,76%	91,77%
Mediana		55,36%	74,14%	87,41%	89,22%
Desvio Padrão		20,71%	20,26%	11,69%	10,47%
Mínimo		18,52%	12,5%	57,14%	64,21%
Máximo		91,58%	89,29%	93,16%	97,64%

Após a análise estatística descritiva, procedeu-se à análise estatística inferencial baseada na comparação das médias variáveis TMT e melhoria cumulativa (%) para os diferentes momentos de contagem e após cada exposição à radiação UV. Para tal foram realizados testes ANOVA. Foram encontradas diferenças significativas entre os cinco momentos de contagem – TMT ($F(4, 70) = 5,762$, $p < 0,001$). Os testes post-hoc de Tukey HSD indicam que há diferenças significativas entre as contagens no momento 1 e 4 ($p=0,004$, diferença média = 9308,67), 1 e 5 ($p=0,002$, diferença média = 9791,33), e 1 e 6 ($p=0,001$, diferença média = 10271,33). Não há diferenças significativas entre os momentos 1 e 3, e entre 3 e 4, 5 ou 6.

A figura 27 representa a média da variável TMT por momento de contagem e demonstra graficamente a diferença estatística entre o momento 1 e os momentos 4, 5 e 6, bem como a ausência de diferença entre 1 e 3 e entre 3 e 4, 5 ou 6.

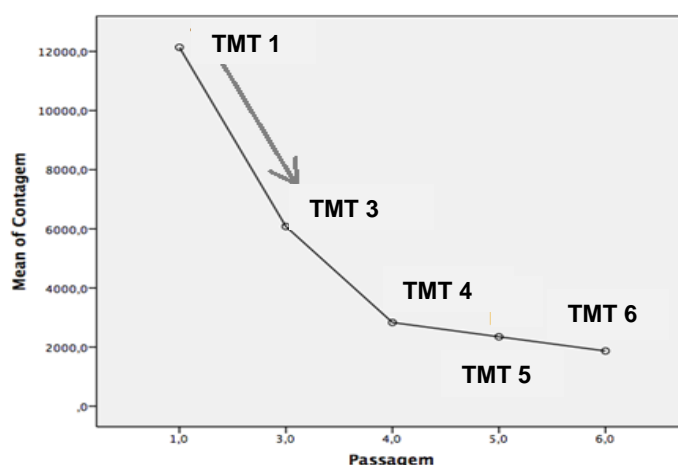


Figura 27. Média do teor de microrganismos totais (TMT) ao longo dos momentos de contagem (1 a 6).

Foram encontradas diferenças significativas entre as melhorias percentuais após cada passagem ($F(3, 55) = 9,829$, $p < 0,001$). Os testes post-hoc de Tukey HSD indicam que há diferenças significativas entre melhorias nos momentos 3 e 5 ($p < 0,001$, diferença média = -0,26%), 3 e 6 ($p < 0,001$, diferença média = -0,30). Não há diferenças significativas entre os momentos 3 e 4, e entre 4, 5 ou 6. A figura 28 representa a média da melhoria cumulativa em percentagem por momento de contagem e demonstra graficamente a diferença estatística entre o momento 3 e os momentos 5 e 6, bem como a ausência de diferença entre 3 e 4, e entre 4, 5 ou 6.

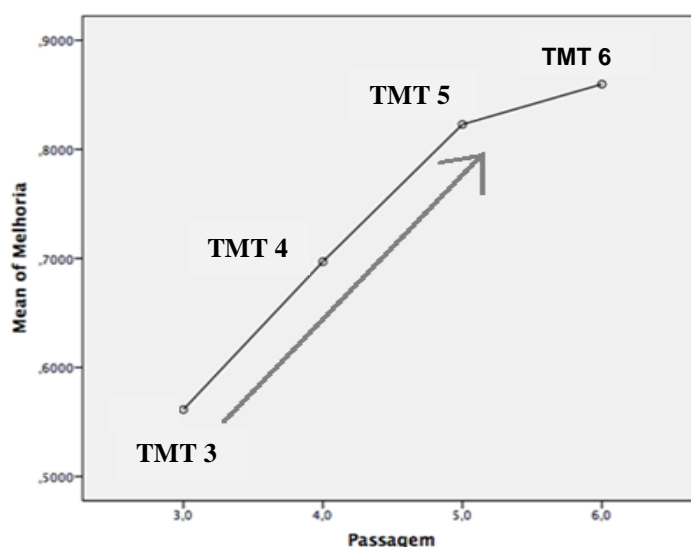


Figura 28. Média da melhoria cumulativa (%) por momento de contagem (3 a 6).

De maneira a apresentar os valores do teor de microrganismos aeróbios totais obtido nas amostras de leite pasteurizado pelo método LTLT, foi feito um resumo dos valores TMT1, TMT2 e TMT6 obtidos nos 15 ensaios efectuados neste trabalho, que está representado na tabela 12. Verifica-se uma redução dos valores de TMT em ambos os tratamentos, sendo que a pasteurização LTLT foi mais eficiente do que a radiação ultravioleta.

Tabela 12. Apresentação dos valores de TMT 1 (ufc/mL) do leite sem tratamento, TMT 2 (ufc/mL) do leite pasteurizado com o método tanque (LTLT) e do valor de TMT 6 (ufc/mL) do leite tratado por radiação ultravioleta com dose 2000 J/L.

Ensaio	TMT 1 (ufc/mL) do leite sem tratamento	TMT 2 (ufc/mL) do leite pasteurizado LTLT	TMT 6 (ufc/mL) do leite UV 2000J/L
1	22000	20	520
2	6400	60	690
3	47000	60	6900
4	28000	110	9000
5	27000	<10	4200
6	14000	<10	3100
7	1900	<10	680
8	2400	10	210
9	4200	10	210
10	2700	<10	320
11	2900	<10	160
12	7400	<10	380
13	7900	<10	380
14	2900	<10	760
15	5400	<10	520

V. DISCUSSÃO

A raça Asinina de Miranda é uma raça autóctone portuguesa em vias de extinção que tem sido beneficiada pela evolução da área da cosmética em Portugal. Havendo interesse na sua conservação e caracterização, têm sido desenvolvidos diversos estudos sobre alguns aspectos reprodutivos carecendo de investigação na área de produção de leite. A produção de leite de forma sustentável, respeitando o bem-estar animal apresenta-se como uma possível solução para a sustentabilidade da raça. A empresa Naturasin Lda, parceira neste estudo, dedica-se à criação de gado asinino de Miranda e à produção e comercialização de leite de burra, possuindo um efectivo de 47 animais, tendo um papel ativo na sua conservação e preservação. Com o intuito de evoluir tecnologicamente a Naturasin propôs que se fizesse um estudo experimental com uma das tecnologias emergentes da atualidade, a radiação ultravioleta. Assim, a presente investigação acenta na contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C do leite de burra da raça Asinina de Miranda tratado com radiação UV.

Foram realizados 15 ensaios, todos efectuados seguindo o mesmo protocolo e nas mesmas condições de trabalho. Nos resultados obtidos verificou-se uma redução estatística significativa no teor de microrganismos aeróbios totais da amostra de leite sem tratamento, TMT 1, com um valor médio de $1,21 \times 10^4 \pm 1,33 \times 10^4$ ufc/mL, para as amostras de leite tratadas com doses UV de 1000 J/L (TMT 4), 1500 J/L (TMT 5), 2000 J/L (TMT 6) com valores médios de $2,83 \times 10^3 \pm 2,73 \times 10^3$, $2,35 \times 10^3 \pm 3,28 \times 10^3$ e $1,87 \times 10^3 \pm 2,75 \times 10^3$ ufc/mL, respetivamente. Em valores percentuais, a redução do valor médio do teor de microrganismos aeróbios totais entre a amostra TMT 1 e a amostra TMT 4 foi de 76,68%, entre TMT 1 e TMT 5 foi de 80,65% e entre TMT 1 e TMT 6 foi de 84,61%. Não se verificaram reduções significativas da amostra TMT 1 para a amostra TMT 3, e desta para as amostras TMT 4, TMT 5 e TMT 6.

Alguns estudos sobre a eficácia da radiação UV na redução de microrganismos em fluidos têm sido feitos, no entanto, as condições de trabalho, o tipo de equipamento UV e o líquido utilizado variam de estudo para estudo, o que torna difícil comparar resultados.

No estudo efetuado por Crook, Rossitto, Jard, Koutchma & James (2015) as doses aplicadas no leite de vaca variaram entre os 0 e os 5000J/L num sistema piloto UV de fluxo turbulento. Verificou-se uma redução logaritmica de 5 na *Listeria monocytogenes* com uma dose de 2000J/L, tendo sido esta a bactéria mais resistente ao tratamento, ao contrário do *Staphylococcus aureus* que exigiu apenas uma dose de 1450J/L para atingir a mesma redução. Já Rossitto et al. (2012) aplicaram no leite de vaca doses UV de 880 J/L e 1760 J/L com um sistema UV de fluxo contínuo turbulento, tendo verificado uma redução superior a 1×10^5 de bactérias psicotróficas e mesófilas, uma redução superior a 1×10^6 de esporos

aeróbios e uma redução de 1×10^7 de coliformes, defendendo que os intervalos de dose UV adequados são de 1000 a 1600 J/L para processamento do leite. Também Reinemann et al. (2006) aplicaram no leite de vaca uma dose de 1500J/L através de um equipamento UV com fluxo turbulento, e relataram uma redução logarítmica de 1×10^3 em microorganismos psicotróficos, coliformes e termodúricos. Relatam ainda que a dose máxima de UV para se manter as características organolépticas do leite foi de 1000J/L.

A enologia pode também ser uma área a beneficiar com a radiação UV, Durner et al. (2017) investigaram a aplicabilidade da radiação ultravioleta na inativação de leveduras e bactérias no mosto e no vinho. Para tal utilizaram um equipamento UV de fluxo turbulento composto por uma lâmpada de baixa pressão. Concluíram que aplicando a dose de 1000J/L, o *Saccharomyces cerevisiae*, a *Hanseniaspora uvarum*, o *Brettanomyces bruxellensis*, o *Schizosaccharomyces pombe* e o *Lactobacillus plantarum* foram totalmente inativados.

Analisando os estudos anteriores podemos verificar que as doses de radiação ultravioleta usadas na presente dissertação se assemelham com as doses acima descritas. Relativamente ao equipamento UV, existem diversos factores que influenciam directamente o resultado final, tais como o tipo de fluxo, o tipo e o número de lâmpadas e o *design* das estruturas. Nos estudos acima descritos foram usados equipamentos com fluxo turbulento, ao contrário do equipamento com fluxo laminar que fez parte deste trabalho, facto que pode ser um ponto crucial na elevada redução logarítmica alcançada por estes autores. A utilização do fluxo turbulento é recomendada pela FDA uma vez que favorece a homogeneização do fluido a ser tratado.

Não foi encontrada na literatura nenhuma recomendação específica da *Food and Drug Administration* relativa ao uso da radiação ultravioleta na inativação de microorganismos no leite. No entanto, foi aprovado o uso da radiação UV na desinfeção de superfícies alimentares e no tratamento de água e alimentos líquidos em condições específicas (US CFR, 2005). As recomendações da FDA referentes aos sumos indicam que o processo deve garantir uma redução de pelo menos 5 reduções logarítmicas do microorganismo presente mais resistente em condições operacionais específicas (FDA, 2001, 2004). Embora no presente estudo não se tenham atingido reduções para além de 1 redução logarítmica, é fundamental ressaltar que o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da radiação UV no teor de microrganismos aeróbios totais a 30°C do leite de burra que tem como destino final apenas o mercado da cosmética.

Durante a avaliação das análises realizadas por vários autores acerca da radiação UV em diferentes tipos de líquidos, verificou-se a necessidade de conversão de unidades das doses UV utilizadas, joule por litro, para as unidades das doses apresentadas nos diferentes estudos, milijoule por centímetro quadrado, de maneira a facilitar a sua interpretação e

discussão. Assim, atendendo às condições e ao equipamento utilizado nesta dissertação, à dose UV de 500 J/L corresponde a dose de 6,34 mJ/cm², à dose de 1000J/L corresponde a dose de 25 mJ/cm², à dose de 1500 J/L corresponde a dose de 37,66 mJ/cm², e à dose de 2000J/L corresponde a dose de 96, 38 mJ/cm².

Retomando a área da enologia, Kaya & Unluturk, (2016) trataram sumo de uva com níveis de turbidez diferentes num sistema UV de fluxo contínuo constituído por seis lâmpadas UV de baixa pressão, tendo como objetivo avaliar a inativação de bactérias do ácido láctico e leveduras. No sumo de uva com menor grau de turbidez conseguiram uma redução de *Saccharomyces cerevisiae* de $3,39 \pm 0,04$ log utilizando uma dose de 65,50 mJ/cm², enquanto que no sumo de uva com maior turbidez, nas leveduras alcançaram uma redução de $1,54 \pm 0,04$ log usando uma dose de 78,56 mJ/cm² e nas bactérias do ácido láctico atingiram uma redução de $1,64 \pm 0,03$ log usando uma dose de 67,97mJ/cm². Concluíram ainda que a maioria das propriedades físico químicas das amostras de sumo de uva não foram afetadas significativamente pela radiação UV. Estes resultados demonstram a importância da capacidade de penetração da radiação UV, que depende diretamente do coeficiente de absorção do líquido, sendo este influenciado pela cor ou turvação do líquido a ser tratado. Assim, quanto maior a turbidez do líquido, maior é o seu coeficiente de absorção, sendo menor a capacidade de penetração da radiação UV. Posto isto, os resultados obtidos por Kaya & Unluturk (2016) retratam bem esta dificuldade de penetração, uma vez que a redução logarítmica foi menor no líquido com maior grau de turbidez. É por isso aceitável a semelhança entre a redução logarítmica atingida no mosto com maior grau de turbidez e a redução logarítmica atingida no leite de burra, pois este apresenta também um elevado grau de turbidez.

É no tratamento da água que a radiação ultravioleta já é bastante utilizada, e segundo Hijnen, Beerendonk & Medema (2006) os dados da literatura sobre a inativação com radiação UV demonstram que o processo é efetivo contra todos os microrganismos patogénicos relevantes da água potável, sendo muito eficaz contra oocistos de *Cryptosporidium* e *Giardia*, dois microrganismos patogénicos de grande importância na segurança alimentar. Resultados do estudo feito por Betancourt & Rose (2004) demonstraram a inativação de 1×10^4 de quistos de *Giardia lamblia* em água, com doses UV de 1mJ/cm². O facto da dose utilizada neste estudo ser tão baixa poderá estar relacionado com o baixo coeficiente de absorção da água, aumentando a capacidade de penetração da radiação UV.

Ochoa-Velasco, Cruz-González & Guerrero-Beltrán (2014) analisaram o efeito da radiação UV na bebida vegetal de côco inoculado com *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* através de um equipamento com fluxo turbulento, e mostraram uma redução logarítmica máxima de $4,1 \pm 0,1$. As reduções de mesófilos, fungos e leveduras foram de 2 e

1,3 reduções logarítmicas, respetivamente, com a dose de 102,6 mJ/cm². Verificaram ainda a alteração da cor da bebida vegetal de côco após o tratamento UV. Relativamente ao leite de cabra, Segundo Matak et al. (2005), a radiação UV pode ser utilizada para a redução de *Listeria monocytogenes*, pois constataram uma redução maior que 1x10⁵ com uma dose de 15,8 ± 1,6 mJ/cm² utilizando um sistema de tratamento UV de fluxo turbulento composto por 8 lâmpadas de baixa pressão e com um *design* adaptado a líquidos com algum grau de turbidez. Também Lu et al., (2011), utilizaram um equipamento UV com um *design* específico, neste caso tratou-se de um sistema com estruturas em forma de espiral que facilitam a exposição total do leite à radiação aplicada. Trataram leite de vaca com uma dose de 21,3 mJ/cm² e verificaram 3 a 4 reduções logarítmicas nas bactérias aeróbias totais presentes no leite. Analisando os estudos realizados pelos autores acima descritos, relativamente às doses utilizadas podemos verificar que as doses deste trabalho se enquadram nos intervalos apresentados. Quanto ao equipamento, a abordagem feita neste trabalho pode ser caracterizada como mais conservadora, na medida em que o sistema UV possui apenas uma lâmpada de baixa pressão, um fluxo laminar e um *design* não específico para tratamento de líquidos com turbidez e que não facilita a exposição total do líquido à radiação UV. Um fluxo em tubos helicoidais, para além de aumentar a exposição do líquido à radiação UV, pode ser uma opção para reduzir o fenómeno de *fouling*, que é considerado um fator limitante na eficiência dos reatores dos equipamentos de tratamento UV convencionais. Contudo, foi possível avaliar o efeito da radiação UV na contagem de microrganismos aeróbios totais a 30°C no leite de burra da raça Asinina de Miranda, verificando-se uma redução máxima de 1 redução logarítmica com a dose de 2000J/L. Perante estes resultados, a empresa Naturasin Lda. optou por associar o tratamento UV na dose de 1000 J/L à pasteurização LTLT obtendo regularmente contagens de microrganismos aeróbios totais a 30°C inferiores a 10 ufc/mL, valor nem sempre atingido quando utilizavam apenas a pasteurização LTLT.

VI. CONCLUSÃO

A presente revisão bibliográfica juntamente com a descrição do procedimento experimental e com a discussão dos resultados obtidos nos ensaios realizados, permitiram concluir que a radiação ultravioleta é uma tecnologia emergente eficiente na redução do valor microbiano do leite que pode ser utilizada como alternativa aos tratamentos térmicos tradicionais ou ser usada em associação com estes, dependendo do destino final do leite e dos valores de ufc/mL pretendidos. Este estudo apresenta-se como inovador na aplicação da radiação ultravioleta no leite de burra da raça Asinina de Miranda pois não existia, na literatura atual, qualquer informação sobre a aplicação da radiação ultravioleta em leite de burra que permitisse a comparação dos dados agora obtidos. Muitas linhas de investigação presentes neste trabalho devem ser aprofundadas, nomeadamente a análise sensorial, físico-química e microbiológica descritiva do leite tratado com radiação ultravioleta, a fim de permitir o conhecimento do impacto da radiação UV nestas características do leite, facilitando assim um estudo de viabilidade económica. Uma vez que se trata de uma raça autóctone em vias de extinção, urge reforçar a sensibilização da população para projetos de preservação e conservação da nossa raça Asinina de Miranda, a fim de evitar a sua extinção.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, F., Candeias, G., Pratas, M. (2013). *Raças Autóctones Portuguesas*. Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Lisboa. 39-43.

Albalact (2015). Disponível *online* em: <http://www.albalact.ro/en/about-pasteurised-and-ugt-milk.html>.

Alberini, F., Simmons, M.J.H., Parker, D.J., Koutchma, T. (2015). Validation of hydrodynamic and microbial inactivation models for UV-C treatment of milk in a swirl-tube “Surepure turbulator”. *Journal of food engineering*. 162, 63-69.

Almeida, A. (2006). *Controle rápido da eficiência e segurança do processo de pasteurização do leite HTST (high temperature short time)*. Tese de mestrado em Medicina veterinária. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Alvarez, A., Serres, C., Gabriel, J. & Gómez-Cuétara, C. (2005). La Reproducción en el asno. El garañón. *Equinus: medicina y cirugía equina*. 29-39.

Alzamora, S., Welti-Chanes, J., Guerrero, S. & Gómez, P. (2012). Rational use of novel technologies: a comparative analysis of the performance of several new food preservation technologies for microbial inactivation. *Novel Technologies in Food Science*. 235-260

Andrade, P.V.D., Souza, M.R., Penna, C.F.A.M., Ferreira, J.M. (2008). Características microbiológicas e físico químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. *Ciencia Rural, Santa Maria*. 38, 1424-1430.

Aranguren-Méndez, J., Jordana, J. & Gomez, M. (2001). Genetic diversity in Spanish donkey breeds using microsatellite DNA markers. *Genetics, Selection, Evolution*. 33,433-442.

Arcuri, E., Brito, M., Brito, J., Pinto, S., Ângelo, F. & Souza, G. (2006). Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. Volume 58, 440-446.

Arcuri, E., Lima da Silva, P., Brito, M., Brito, J., Lange, C. & Magalhães, M. (2008). Contagem, isolamento e caracterização de bactérias psicotróficas contaminantes de leite cru refrigerado. *Ciência Rural, Santa Maria*. Volume 30, 2250-2255.

Associação para o Estudo e Protecção do Gado Asinino. (2012). Disponível *online* em: www.aepga.pt.

Atkins, P. & Jones, L. (2012). *Princípios de química - questionando a vida moderna e o meio ambiente*. (5ª edição). Bookman.

Aubert, M. (1987). *Tiro y las colonias fenicias de Occidente*. Bellaterra. Barcelona

Bandla, S., Choudhary, R., Watson, D. & Haddock, J. (2012). *UV-C treatment of soymilk in coiled tube UV reactors for inactivation of Escherichia coli W1485 and Bacillus cereus endospores*. Southern Illinois University Carbondale.

Barbosa, J. (2003). *O gado asinino em Trás-os-Montes. Contribuição para o conhecimento da sua importância socio-económica*. Escola Superior Agrária de Bragança.

Barbosa-Cánovas, G., Tapia, M. & Cano, M. (2004). *Novel food processing technologies*. New York.

Beja-Pereira, A. & Almeida, N. (2005). *Genética, Biotecnologia e Agricultura*. SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação. Porto, 1ª edição.

Beja-Pereira, A., England, P., Ferrand, N., Jordan, S., Bakhiet, A., Abdalla, M., Mashkour, M., Jordana, J., Taberlet, P. & Luikart, G. (2004). African Origins of the Domestic Donkey. *Science Magazine*. 304, 1781.

Bennewitz, J., Kantanen, J., Tapio, I., Li, M., Kalm, E., Vilkki, J., Ammosov, I., Ivanova, Z., Kiselyova, T., Popov, R. & Meuwissen, T. (2006). Estimation of breed contributions to present and future genetic diversity of 44 North Eurasian cattle breeds using core set diversity measures. *Genetics, Selection, Evolution*. 38, 201-220.

Beretti, V., Zanon, A., Soffiantini, C. & Sabbioni, A. (2005). *Preliminary results about morphological and demographic traits of romagnolo donkey*. Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria de la Università di Parma. 25, 131-144.

Betancourt, Q. & Rose, J.B. (2004). Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary parasitology*. 126, 219-234.

Blanchard, T., Taylor, T. & Love, C. (1999). Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus asinus americanus*). *Theriogenology*. 52, 927-834.

Blanchard, T. & Taylor, T. (2005). *Estrous cycle characteristics of donkeys with emphasis on standard and mammoth donkeys*. Texas Veterinary Medical Center, Texas A&M University, College Station.

Blench, R. (2004). The history and spread of donkeys in Africa. *Donkeys, people and development: a resource book for the animal traction network of east and southern Africa*. 22-30.

Bolton, J. (2000). Terms and definitions in ultravioleta disinfection. *Proceedings of "Disinfection 2000"*. New Orleans.

Bolton, J.R. & Cotton, C.A. (2008). *The ultraviolet disinfection-Handbook*. American water works association. U.S.A.

Braga, N.C. (2017). Instituto Newton Braga. Disponível em www.newtoncbraga.com.br

Burton, H. (1994). *Ultra high temperature processing of milk and milk products*. Springer science and business media. New York.

Caballero, B., Finglas, P.M. & Toldrá, F. (2016). *Encyclopedia of food and health*. Elsevier. Oxford.

Cáceres de Menezes, M., Simeoni, C., Poletto, G., Barin, J., Cichoski, A. & Ragagnin de Menezes, C. (2014). Radiação micro-ondas: aplicações em alimentos e impactos microbiológicos na carne. *Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas*. Santa Maria.

Camac, R. (1986). *Introduction and origins of the donkey*. Sidmouth, Devon.

- Carette, J. (2000). *L'Abcdaire de l'Ane*. Flammarion Editions. Paris.
- Carroccio, A. Cavataio, F., Montalto, G., D'Amico, D., Alabrese, L. & Iacono, G. (2000). Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical & Experimental Allergy*. 30:1597-1603.
- Castro, I. (2008). Aquecimento Óhmico, Novas tecnologias de processamento alimentar. Segurança e qualidade alimentar. Maio 4. 38-39.
- Chavatte-Palmer, P. (2002). Lactation in the mare. *Equine Veterinary Education*. 5:88-93.
- Chen, J., Sun, Y., Manglai, D., Min, L. & Panet, Q. (2010). Maternal genetic diversity and population structure of four Chinese donkey breeds. *Livestock Science*. 131, 272-280.
- Chiofalo, B., Miraglia, N. & Martin-Rosset, W. (2006). Different fibre sources in dairy ass's diet II. Effects on plasma fatty acid profile. Nutrition and feeding of the broodmare. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 179-180.
- Chiofalo, B., Polidori, P. & Vincenzetti, S., (2015). *Milk Production and Characteristics of the Milk of the Jenny*. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280037622_Milk_Production_and_Characteristics_of_the_Milk_of_the_Jenny
- Choudhary, R. & Bandla, S. (2012). Ultraviolet pasteurization for food industry. *International journal of food science and nutrition engineering*. 2, 12-15.
- Ciampolini, R., Cecchi, F., Mazzanti, E., Ciani, E., Tancredi, M. & Sanctis, B. (2007). The genetic variability analysis of the Amiata donkey breed by molecular data. *Italian Journal of Animal Science* (Bologna). 6, 78-80.
- Claeys, W.L., Cardoen, S., Daube, G., Block, J., Dewettinck, K., Dierick, K., Zutter, L., Huyghebaert, A., Imberechts, H., Thiange, P., Vandenplas, Y., Herman, L. (2013). *Food control*. 13, 251-262.
- Claeys, W., Verraes, C., Cardoen, S., Block, J., Huyghebaert, A., Raes, K., Dewettinck, K. & Herman, L. (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control*. 42, 188-201.
- Code of Federam Regulation (2005). Code of federal regulation, 21. 179.39. US Government printing office, Washington DC.
- Coelho, G. (2002). Efeitos da alta pressão hidrostática em alimentos: aspectos físico-químicos. *Revista Universidade Rural, Série Ciências Exatas e da Terra*. Volume 21, 105-110.
- Colli, L., Perrotta, G., Negrini, R., Bomba, L., Bigi, D., Zambonelli, P., Supplizi, A., Liotta, L. & Ajmone-Marsanet, P. (2013). Detecting population structure and recent demographic history in endangered livestock breeds: the case of the Italian autochthonous donkeys. *Animal genetics journal* 44, 69-78.
- Coppola, R., Salimei, E., Succi, M., Sorrentino, M., Nanni, M., Ranier, P., Belli Blanes, R. & Grazia, L. (2002). Behaviour of *Lactobacillus rhamnosus* strains in ass's milk. *Annals of Microbiology*. 52, 55-60.

Corzo, N., Lopez-Fandiño, R., Delgado, T., Ramos, M. Olano, A. (1994). Changes in furosine and proteins of UHT-treated milks stored at high ambient temperatures. *Lebensm untersforsch.* 198, 302-306.

Criscione, A., Cunsolo, V., Bordonaro, S., Guastella, A., Saletti, R., Zuccaro, A., D'Urso, G., Marletta, D. (2008). Donkeys' milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. *International dairy journal.* 1-8.

Crook, J.A., Rossitto, P.V., Jared, P., Koutchma, T., James, C. (2015). Efficacy of ultraviolet light in a thin film turbulent flow for the reduction of milkborne pathogens. *Foodborne pathogens and disease.* 12.

Cunningham, J.G. & Klein, B.G. (2008). *Tratado de fisiologia veterinária.* (4ª edição). Saunders. Elsevier.

Datta, N., Elliot, A.J., Perkins, M.L., Deeth, H.C. (2002). Ultra high temperature (UHT) treatment of milk: comparison of direct and indirect modes of heating. *Australian journal of dairy technology.* 57, 211-227.

Decreto-Lei nº 189/2008 de 24 de setembro. *Diário da República nº 185 – 1 série.* Ministério da Saúde.

Devlieghere, F., Vermeiren, L., Debevere, J. (2004). New preservation technologies: possibilities and limitations. *International dairy journal.* 14, 273-285.

Durner, D., Diesler, K., Golombek, P., Kromm, L., Stahl, M., Briviba, K., Scharfenberger-Schmeer, M., Fischer, U. (2017) Inactivation of microorganisms by UV-treatment of must and wine. *40th world congress of vine and wine.*

Elmnasser, N., Guillou, S., Leroi, F., Orange, N., Bakhrouf, A., Federighi, M. (2007). Pulsed light system as a novel food decontamination technology: a review. *Canadian journal of microbiology.* 53, 813-821.

Engin, B. & Yuceer, Y.K. (2012). Effects of ultraviolet light and ultrasound on microbial quality and aroma active components of milk. *Journal science of food agriculture.* 90, 1245-1252.

Environmental Protection Agency (2006). Ultraviolet disinfection guidance manual for the final long term to enhanced surface water treatment rule. United States Environmental Protection Agency.

European Food Safety Authority (2016). Safety of UV-treated milk as a novel food pursuant to Regulation (EC) No 258/97 - EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA).

Epstein, H. (1984). Ass, mule and onager. In *Evolution of Domesticated Animals.* Longman, London and New York. 174-184.

Evans, J., Burton, A., Hintz, H., Van Vleck, L. (1979). *El Caballo.* Editora Acriba, Zaragoza, Espanha.

Fantuz, F., Maglieri, C., Lebboroni, G., Salimei, E. (2009). Ca, Mg, Zn, Fe, Cu and Mn content of ass's milk. *Italian journal of animal science.* 8, 703-705

Faye, B., Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector e the growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International dairy journal*. 24, 50-56.

Fellows, P. (2000). *Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática*. 2ª edição. Artmed, Porto Alegre.

Fielding, D. (1988). Reproductive characteristics of the jenny donkey – *Equus asinus*: a review. *Tropical animal health production*. 20, 161-166.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2000). Disponível online em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/en/>

Food and Agriculture Organization (FAO). (2007). The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture - in brief. Comission on genetic Resources for Food and Agriculture, Rome.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2009). Threats to animal genetic resources – their relevance, importance and opportunities to decrease their impact. CGRFA Background Study Paper No. 50. Rome. Disponível online: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/017/ak572e.pdf>.

Food and Agriculture Organization (FAO). (2013) The State of Food and Agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Food and Drug Administration (FDA). (2001). Hazard analysis and critical control points (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing juice: final rule. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration.

Food and Drug Administration (FDA). (2004). Guidance for industry, juice HACCP hazards and controls guidance. Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration.

Food and Drug Administration (FDA). (2011). Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. High Pressure Processing. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcessing/ucm101456.htm>

Forney, L. J., & Pierson, J. R. (2003). Optimum photolysis in Taylor–Couette flow. *AIChE Journal*. 49, 727–733.

Fox, P.F. & McSweeney, P.L.H. (1998). *Dairy chemistry and biochemistry*. Blackie academy & professional. New York.

Fox, P.F., Uniacke-Lowe, T., McSweeney, P.L.H., O'Mahony, J.A. (2015). *Dairy chemistry and biochemistry*. (2nd edition). Springer. New York.

Franco, B., Landgraf, M. (2003). *Microbiologia dos alimentos*. Atheneu, São Paulo.

Frantz, A., Wilson, J. (1985). *Endocrine disorders of the breast*. Saunders Co, Philadelphia. 402-421.

Galisteo, J., Perez-Marin, C. (2010). Factors Affecting Gestation Length and Estrus Cycle Characteristics in Spanish Donkey Breeds reared in Southern Spain. *Theriogenology*. 74, 443-450

Gelsinger, S., Gray, S., Jones, C., Heinrichs, A. (2014). Heat treatment of colostrum increases immunoglobulin g absorption efficiency in high, medium, and low-quality colostrum. *Journal of dairy science*. 97, 2355-2360.

Ghezzi, M., Castro, A., Dominguez, M., Islas, S., Illia, M. (2011). *Anatomía regional y veterinaria de los animales domesticos - glandula mamaria*. Departamento de Ciencias Biológicas, Área Anatomía II, Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

Ginther, O. (1987). Relationship among number of embryos and type of multiple ovulations, number of embryos and type of embryos fixation in mares. *Journal of equine veterinary science*. 7, 82-88.

Ginther, O. (1993). Major and minor follicular waves during the equine estrous cycle. *Journal of equine veterinary science*. 13, 18-25.

Ginther, O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal reproduction science*. 60, 61-79.

Ginther, O.J., Araujo, R.R., Palhão, M.P., Rodrigues, B.L., Beg, M.A. (2009). Necessity of sequential pulses of prostaglandin F2 alpha for complete physiologic luteolysis in cattle. *Biology of reproduction*. 80, 641-648.

Gómez-López, V.M., Ragaert, P., Debevere, J., Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: a review. *Trends in food science and technology*. 18, 464-473.

Gorouhi, F., Maibach, H. (2009). Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *International journal of cosmetic science*. 31, 327-345.

Gould, G.W. (1995). *New methods of food preservation*. Springer science business media.

Guedes, A.M.M., Novello, D., Mendes, G.M.P., Cristianini, M. (2009). Tecnologia de ultravioleta para preservação de alimentos. *Ceppa*. 27, 59-70.

Guerrero-Beltrán, J.A. & Barbosa-Cánovas, G.V. (2004). Review: advantages and limitations on processing foods by UV light. *Food science and technology international*.

Gunesser, O. & Yuceer, K. (2012). Effect of ultraviolet light on water and fat soluble vitamins in cow and goat milk. *Journal of dairy science*. 95, 6230-6241.

Guo, H., Pang, K., Zhang, X., Zhao, L., Chen, S., Dong, M., Ren, F. (2007). Composition, physiochemical properties, nitrogen fraction distribution, and amino acid profile of donkey milk. *Journal of dairy science*. 90, 1635-1643.

Gurtler, H., Ketz, A., Kolb, E., Schroder, L., Seidel, H. (1984). *Fisiologia Veterinária*. (4ª Edição). Editora Guanabara Koogan. 374-387.

Hafez, E. (1980). *Reproduction in farm animals*. (4th edition). Lea & Febiger, Hagerstown.

Hagstrom, D. (2004). *Donkeys are different: an overview of reproductive variations from horses*. University of Illinois: U.S. Department of agriculture/local extension councils cooperating.

Hajdenwurcel, J.R. (1998). *Atlas de microbiologia de alimentos*. São Paulo.

Hardik, P. & Atanu, J. (2017). HTST or UHT Pasteurisation – the milk debate. *Food marketing & technology*. Disponível online em: <http://fmtmagazine.in/htst-uht-pasteurisation-milk-debate>.

Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water research*.40, 3-22.

Hoet, A.E. (2011). *Manual de saúde pública veterinária – uma saúde*. Projeto sapuvetnet III.

Hoffman, I. (2010). Livestock biodiversity. *Scientific and technical review of the office international des epizooties*, Paris. 29, 73-86.

International Standard ISO 6887-2 (1999). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbial examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. Organization for standardization. Switzerland.

Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005). *Modern food microbiology*. (7th edition). Heldman Associates, San Marcos, California.

Kaya, Z. & Unluturk, S. (2016). Processing of clear and turbid grape juice by a continuous flow UV system. *Innovative food science and emerging technologies*. 33, 282-288.

Kalender, H., Aslan, S., Schwarzenberger, F., Maral, N., İzgür, H., Handler, J., Findik, M. (2012). Uterine involution, follicle development and concentrations of plasma progesterone, 20 α -oh-progesterone and total estrogen levels during the postpartum period in anatolian donkeys. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 18, 929-933.

Kasahara, I., Carrasco, V., Aguilar, L. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* in goat milk using ultraviolet light. *Journal of food engineering*. 152, 43-49.

Karatosidi, D., Marsico, G., Tarricone, S. (2013). Modern use of donkeys. *Iranian journal of applied animal science*. 3, 13-17.

Kimura, B., Marshall, F., Chen, S., Rosenbom, S., Moehlman, P., Tuross, N., Sabin, R., Peters, J., Barich, B., Yohannes, H., Kebede, F., Teclai, R., Beja-Pereira, A., Mulligan, C. (2010). Ancient DNA from Nubian and Somali wild ass provides insights into donkey ancestry and domestication. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, London. 278, 50-57.

Klein, B. (2014). *Cunningham: tratado de fisiologia veterinária*. (5ª Edição). Elsevier editora Ltda. Rio de Janeiro, Brasil.

Kneissl, M. & Rass, J. (2016). *III Nitride ultraviolet emitters – technology and applications*. Springer. New York.

Kolakowska, A. & Bartosz, G. (2003). *Chemical, biological and functional aspects of food lipids*. (2nd Edition).

Kolb, G. (1907). Public Documents of the State of Wisconsin.

Koutchma, T. (2009). Advances in ultraviolet light technology for non thermal processing of liquid food. *Food bioprocess technology*. 2, 138-155.

Koutchma, T., Keller, S., Chirtel, S., Parisi, B. (2004). Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors. *Innovative food science and emerging technologies*. 5, 179-189.

Kowalski, W. (2009). *Ultraviolet germicidal irradiation handbook*. Springer. New York.

Krishnamurthy, K., Demirci, A., Irudayaraj, J.M. (2007). Inactivation of *Staphylococcus aureus* in milk using flow through pulsed UV light treatment system. *Journal of food science*.

Kugler, W., Grunenfelder, H., Broxham, E. (2008). Donkey breeds in Europe - Inventory, description, need for action, conservation. *Monitoring institute for rare breeds and seeds in Europe*. Switzerland.

Lacy, R. (1995). Clarification of genetic terms and their use in the management of captive populations. *Zoo Biology*. 14, 565-578.

Lado, B., Yousef, A. (2002). Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and infection*. 4, 433-440.

Lafarge, V., Ogier, J., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and environmental microbiology*. 90, 5644-5650.

Leite, Z., Vaitsman, D., Dutra, P., Guedes, A. (2006). Leite e alguns de seus derivados – da antiguidade à atualidade. *Química nova*. 29, 876-880.

Lewis, M., Heppell, N. (2000). *Continuous thermal processing of foods: pasteurization and UHT sterilization*. Springer.

Lima, C., Lima, L., Cerqueira, M., Ferreira, E., Rosa, C. (2009). Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 58, 266-272.

Lindsay, E., Opdyke, N., Johnson, N. (1980). Pliocene dispersal of the horse *Equus* and late Cenozoic mammalian dispersal events. *Nature*. 287, 135-138.

López-Malo, A., Palou, E. (2005). *Ultraviolet light and food preservation*. New York.

Lu, G., Li, C., Liu, P. (2011). UV inactivation of milk related microorganisms with a novel electrodeless lamp apparatus. *European food research and technology*. 233, 79-87.

Lucey, J. (2015). Raw milk consumption. *Nutrition and food science*. 50, 189-193.

Marquenie, D., Geeraerd, A.H., Lammertyn, J., Soontjens, C., Van, I.J.F., Michiels, C.W., Nicolai, B.M. (2003). Combinations of pulsed white light and ultraviolet C or mild heat

treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena*. *International journal of food microbiology*. 85, 185-196.

Márquez, M.J.G. (2007). *Proyectos de fin de carrera de ingeniería química*. Universidad de Cádiz.

Matak, K.E. (2004). *Effects of UV irradiation on the reduction of bacterial pathogens and chemical indicators of milk*. A dissertation submitted to the graduate faculty of Virginia polytechnic institute and state university in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctorate of philosophy in food science and technology.

Matak, K., Churey, J., Worobo, R., Sumner, S., Hovingh, E., Hackney, C., Pierson, M. (2005). Efficacy of UV light for the reduction of *Listeria monocytogenes* in goat's milk. *Journal of food protection*. 68, 2212-2216.

Mathias, S., Rosenthal, A., Gaspar, A., Deliza, R., Slongo, A., Vicente, J., Masson, L., Barbosa, C. (2010). Alterações oxidativas (cor e lipídios) em presunto de peru tratado por Alta Pressão Hidrostática (APH). *Ciência tecnologia dos alimentos*. Campinas.

McDonell, S. (1998). Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). *Applied animal behaviour science*. 60, 277-282.

Menezes, M., Simeoni, C., Etchepare, M., Huerta, K., Bortoluzzi, D., Ragagnin de Menezes, C., (2014). Microbiota e conservação do leite. *Revista do centro de ciências naturais e exatas*. UFSM. 18, 76-89.

Micali, M., Fiorino, M., Parisi, S. (2016). *The chemistry of thermal food processing procedures*. Springer.

Milk Facts. (2017). The milk quality improvement program. Department of food science college of agriculture and life sciences. Cornell University. Disponível online em: <http://www.milkfacts.info/Milk%20Processing/Heat%20Treatments%20and%20Pasteurization.htm>

Moraes, I. (2016). *Fisiologia da glândula mamária*. Universidade Federal Fluminense.

Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2014). (7ª edição). *Microbiologia Médica*. Elsevier Editora. Rio de Janeiro.

Nadal, J. (2000). Estat de la qüestió dels inicis de la ramaderia a Catalunya. *La Prehistòria. Estudis d'Història Agrària*. 14,19-39.

Nadal, J., Albizuri, S., Maroto, J. (2010). Els orígens del burro domèstic a la Mediterrània i a la península Ibèrica segons les dades arqueològiques. *Quaderns, Banyoles*. 37-56.

Nishikawa, Y., Yamazaki, Y. (1999). Studies on reproduction in asses I. Breeding season, oestrous cycle and length of heat. *Japanese journal of zootechnical science*. 19,119-124.

Nóbrega, F.G. & Bossolan, N.R.S. (2010). Invisíveis, hóspedes e bem vindos: os microrganismos. Coleção explorando o ensino – Ciências Volume 18.

Norma Portuguesa NP-4405 (2002). Microbiologia alimentar. Regras gerais para a contagem de microrganismos a 30°C. Instituto português de qualidade. Lisboa.

Nornberg, M., Tondo, E., Brandelli, A. (2009). Bactérias psicrófilas e atividade proteolítica no leite cru refrigerado. *Acta scientiae veterinariae*. 37, 157-163.

Noro, G. (2001). *Síntese e secreção do leite*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Nunes, C. & Baptista A. (2001). Implicações da reacção de Maillard nos laticínios e nos sistemas biológicos. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. 96, 53-59.

Ochoa-Velasco, C.E., Cruz-González, M., Guerrero-Béltran, J.A. (2014). Ultraviolet C light inactivation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in coconut (*cocos nucifera* L) milk. *Innovative food science and emerging technologies*. 26, 199-204.

Oliveira, P.H.B. & Anjos, V.C. (2012). Efeitos do tratamento do leite por radiação ultravioleta em comparação à pasteurização. *Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes*. 67, 81-82.

Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2010). Pulsed light treatments for food preservation. A review. *Food bioprocess technology*. 3, 13-23.

Ordóñez, J. (2004). *Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos*. Artmed, Porto Alegre.

Peaker, M., Wilde, C., Knight, C. (1998). Local control of the mammary gland. *Biochemical society symposia*. 63, 71-79

Pelczar, M.J. & Chan, E.C.S. (1981). *Elements of microbiology*. McGraw-Hill Inc. US.

Pereira, R.V., Bicalho, M.L., Machado, V.S., Lima, S., Teixeira, A.G., Warnick, L.D., Bicalho, R.C. (2014). Evaluation of the effects of ultraviolet light on bacterial contaminants inoculated into whole milk and colostrum, and on colostrum immunoglobulin G. *Journal dairy science*. 97, 2866-2875.

Pereira, R., Rodrigues, R., Teixeira, J., Vicente, A. (2015). Aquecimento óhmico: uma ferramenta ao serviço da biotecnologia. *Boletim de biotecnologia*. 41-43.

Peters, J., Driesch, A., Helmer, D. (2005). The upper Euphrates-Tigris basin: cradle of agro-pastoralism? *9th ICAZ Conference - The First Steps of Animal Domestication*. Oxbow Books, Durham. 96-124.

Polidori, P., Vincenzetti, S. (2012) Protein profile characterization of donkey milk. *Creative commons attribution license*. Disponível online em: <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>

Povoa, M.E.B. & Moraes-Santos, T. (1997). Effect of heat treatment on the nutritional quality of milk proteins. *International dairy journal*. 7, 609-612.

Prata, L.F. (2001). *Fundamentos de Ciência do Leite*. São Paulo: Editora Funep – Unesp.

Price, E. (1984). Behavioral aspects of animal domestication. *The quarterly review of biology*. 59, 1-32.

Quaresma, M. (2014). Anatomia, fisiologia e comportamento reprodutivo em asininos. *II Congresso Internacional de Medicina de Asininos - Maneio Reprodutivo de Asininos*.

Quaresma, M. (2015). *The Asinina de Miranda donkey breed (Equus asinus): demographic analysis and characterization of the reproductive cycles*. PhD dissertation in Veterinary Sciences – Clinical Area. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Quaresma, M., Nóvoa, M., Monteiro, A., Almeida, J., Portaset, M. (2005). A raça Asinina de Miranda. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. 100, 227-231.

Quaresma, M., Rasquinho, A., Gomes, C., Nogueira, J., Payan-Carreira, R. (2007). Comportamento reprodutivo em asininos do Planalto Mirandês. *I Jornadas internacionais de reprodução animal*. Évora.

Quaresma, M., Payan, R. (2012). Características reprodutivas da fêmea Asinina. *I Congresso Internacional de Medicina Veterinária*. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Quaresma, M., Martins, A., Rodrigues, J., Colaço, J., Payan-Carreira, R. (2013). Pedigree and herd characterization of a donkey breed vulnerable to extinction. *Animal*. 8, 354-359.

Ramaswamy, H., Sastry, M., Abdelrahim, K. (2014). *Electro-technologies for food processing series*. Taylors and Francis group. Nova Iorque.

Ramos, A.C. (2017). Breve introducción a la anatomía de la ubre y a la fisiología del ordeño. Universidad politécnica de Madrid.

Rahman, M.S. (2007). *Handbook of food preservation*. (2nd edition). CRC Press. New York.

Reece, W., (2009). (4th edition). *Functional anatomy and physiology of domestic animals*. Wiley-Blackwell.

Reece, W., (2006) (12^a edição). *Dukes, Fisiologia dos Animais Domésticos*. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Regulamento (CE) nº 853/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível *online* em: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0022:0082:PT:PDF>

Regulamento (CE) 189/2008 do Conselho. (2008). Jornal Oficial da União Europeia. Disponível *online* em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0189&rid=1>

Regulamento (UE) 2283/2015 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Novembro de 2015. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível *online* em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R2283&from=PT>

Reinemanm, D.J., Gouws, P., Cilliers, T., Houck, K., Bishop, J.R. (2006). New methods for UV treatment of milk for improved food safety and product quality. *American society of agriculture and biological engineers*.

Rentschler, H.C., Nagy, R., Mouromseff, G. (1940). Bactericidal effect of ultraviolet radiation. *Research department, Westinghouse*. New Jersey.

Rezende-Lago, N., Rossi Jr., O., Vidal-Martins, A., Amaral, L. (2007). Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigénica das cepas isoladas. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*. 59, 1563-1569.

Rischkowsky, B., Pilling, D. (2007). The state of the world's Animal genetic resources for food and agriculture. Rome.

Robertson, A. (1963). The influence of breeding on production efficiency. *Proceedings of the 1st world conference on animal production*. 1, 99-110.

Roberts, P. & Hope, A. (2003). Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light. *Journal of virological methods*. 110, 61-65.

Rocha, G.L. (2004). *Influência do tratamento térmico no valor nutricional do leite fluido*. Universidade católica de Goiás, Departamento de matemática e física - Engenharia dos alimentos. Brasil.

Rodrigues, J., Iralde, E., Pérez, J., Rodriguez, S. (2007). *Manejo y cuidados de un burro - Manual para cuidadores de burros, Zamorano-leonés y de Miranda*. Editora Aszal. 50

Rossel, S., Marshall, F., Peters, J., Pilgram, T., Adams, MD., O'Connor, D. (2008). Domestication of the donkey: timing, processes, and indicators. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America*. 105, 3715-3720.

Rossitto, P.V., Cullor, J.S., Crook, J., Parko, J., Sechi, P., Cenci-Goga, B.T. (2012). Effects of UV irradiation in a continuous turbulent flow UV reactor on microbiological and sensory characteristics of cow's milk. *Journal of food protection*. 12, 2197-2207.

Rowan, N.J., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Fouracre, R.A., McIlvaney, L., Farish, O. (1999). Pulsed light inactivation of food related microorganisms. *Applied and environmental microbiology*. 65, 1312-1315.

Ruiz, J. (2000). *El Asno Zamorano-Leonés, esse gran desconocido*. Instituto de Estudios Zamoranos "Flórian de Ocampo". Zamora.

Salimei, E., Fantuz, F., Coppola, R., Chiofalo, B., Polidori, P., Varisco, G. (2004). Composition and characteristics of ass's milk. *Animal research*. 53, 67-78

Salimei, E., Fantuz, F. (2010). La produzione di latte di asina in una innovativa filiera latte per consumatori di fascia sensibile. *La rivista di scienza dell'alimentazione*. 1, 25-39

Salimei, E. (2011). Animals that produce dairy foods - donkey. 1, 365-373.

Salimei, E., Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International dairy journal* 24, 130-142.

Samper, J., Pycock, J., Mckinnon, A. (2007). *Current therapy in equine reproduction*. Elsevier.

Sanseverino, A. (2001). *Microondas em síntese orgânica*. Química nova.

Santos, E., Zanine, A. (2006). Lactação em éguas. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*. 101,17-23.

Santos, M., Fonseca, L. (2001). Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. *Revista higiene alimentar*. 15, 13-19.

Saraiva, J., Delgadillo, I., Silva, A. (2015). Alta Pressão na Tecnologia Alimentar. Universidade de Aveiro. Disponível online em <https://www.ua.pt/ptaltapressao/PageText.aspx?id=18261>.

Secchi, G. (2008). Role of protein in cosmetics. *Clinics in dermatology*. 26, 321-325.

Sharma, R.R. & Demirci, A. (2003). Inactivation of *E. Coli* 0157: H7 on alfalfa seeds with pulsed ultraviolet light and response surface modeling. *Journal of food science*. 68, 1448-1453.

Silva, J.A. (2000). *Tópicos da tecnologia dos alimentos*. Livraria Varela, São Paulo.

Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. (1997). *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varela.

Soares, F., González, F. (2013). Bioquímica do tecido animal. Programa de pós-graduação em ciências veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Souza, F., Nogueira, M., Nunes, F. (2011). Qualidade microbiológica do leite cru comercializado informalmente na cidade de areia. *Agropecuária técnica*. 31, 168-171.

Starkey, P., Starkey, M. (1996). Regional and world trends in donkey populations. A resource book of the animal traction network for eastern and southern africa (ATNESA). ACP-EU technical centre for agricultural and rural cooperation (CTA). Wageningen, The Netherlands. 244.

Svendsen, E., Bagwell, B., Courtney, J. (1997). *The professional handbook of the donkey*. (2ª Edição). Whittet Books. Suffolk.

Taberner, E., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T., Miro, J. (2008). Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. *Theriogenology*. 70, 1489-1497.

Tamime, A.Y. (2009). *Milk processing and quality management*. Blackwell Publishing Ltd.

Taylor, T., Matthews, N., Blanchard, T. (2002). An overview of reproduction in donkeys. *New England journal of animal health*. 2, 35-37

Tebaldi, V., Oliveira, T., Boari, C., Piccoli, R. (2008). Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Ciencias e tecnologia dos alimentos*. 28, 753-760.

Teixeira de Carvalho, I. (2013). Microbiologia dos alimentos. Disponível *online* em: <https://pt.slideshare.net/AdrianaSantosSilva1/microbiologia-dos-alimentos-28041391>

Travis, L. (1990). *The mule*. J. A. Allen & Co, London.

Tronco, V. (2010). *Manual para inspeção de qualidade do leite*. Universidade federal de Santa Maria.

Valdés, V., Sánchez, A., Labbok, M. (1996). *Manejo Clínico da Lactação*. Revinter.

Vandeplasse, G., Wesson, J., Ginther, O. (1981). Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. *Department of veterinary science*. University Madison, Wisconsin.

Veisseyre, R. (1988). *Lactologia técnica*. (3ª ed.). Acribia Editorial.

Venturini, K., Sarcinelli, M., Silva, L. (2007). Características do Leite. *Boletim técnico da universidade federal do Espírito Santo*.

Villate, J.E. (2005). Teorias da luz – Experiencias. *Departamento de física da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto*. Porto.

Vincenzetti, S., Polidori, P., Mariani, P., Cammertoni, N., Fantuz, F., Vita, A. (2008). Donkey's milk protein fractions characterization. *Food Chemistry*. 106, 640 – 649.

Walter de Santana, E., Beloti, V., Barros, M., Moraes, L., Gusmão, V., Pereira, M. (2001). Milk contamination in different points of the process: Aerobic mesophilics and psychrotrophics microorganisms. *Seminário: ciencias agrárias, Londrina*. 22, 145-154.

Walstra, P. & Jenness, R. (1984). Dairy chemistry and physics. *Scientific research*. Wiley, New York.

Watanuki, M., Gallo, C. (2008). Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico. *Revista de investigação Adolfo Lutz*. 67, 202-207.

Weeks, C.E. & King, R.L. (1985). Bioavailability of calcium in heat processed milk. *Journal of food science*. 50, 1101-1105.

Wiktorsson, H., Nelson, L., Smidner, K., Söderman, L., Lind, O., Önerfors, B., Borgström, G. (2001). Efficient Milking. DeLaval.

Xu, X., Janke, A., Arnason, U. (1996). The complete mitochondrial DNA sequence of the greater indian rhinoceros, rhinoceros unicornis, and the phylogenetic relationship among carnivora, perissodactyla, and artiodactyla (+ cetacea). *Molecular biology and evolution*. 13, 1167-1173.

Yamashita, A.S., Aguiar, H.F., Gut, J.A.W. (2009). Avaliação de pasteurização HTST através de indicador enzimático e histórico de temperatura. *VII Congresso brasileiro de engenharia química em iniciação científica*.

Yanes, G. (1999). *El asno Zamorano-Leonés, una grand raza autóctona*. Diputación de Zamora, Zamora.

Yin, F., Y. Zhu, T., Koutchma, J. Gong. (2015). Inactivation and potential reactivation of pathogenic *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice following ultraviolet light exposure at three monochromatic wavelengths. *Food microbiology*. 46, 329-335.

Youngquist, R., Threlfall, W. (2007). *Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. Current therapy in large animal theriogenology 2*. (2nd edition). Saunders Elsevier, St Louis, EUA. 47-67.

Zhang, X., Zhao, L., Jiang, L., Dong, M., Ren, F. (2008). A atividade antimicrobiana do leite de burra e as suas mudanças microbóticas durante o armazenamento. *Food Control*. 19, 1191-1195.

Zurera-Cosano, G., Moreno-Rojas, R., Amaro-Lopez, M. (1994). Effect of processing on contents and relationships of mineral elements of milk. *Food chemistry*. 51, 75-78.